Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie
und Röntgendiagnostik (Direktor: Prof. Dr. Friedhelm
Heß) im Radiologiezentrum der Philipps-Universität
(Direktoren: Prof.Dr.Dr. E.H.Graul und Prof.Dr.F.Heß)

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS IONISIERENDER STRAHLEN AUF ZELLMEMBRANEN UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER SULFHYDRYLGRUPPEN

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Medizin des hohen Fachbereiches Humanmedizin der
Philipps - Universität Marburg

vorgelegt von :

ASTA KLARNER geb. SOMMER

aus Hamburg

Marburg 1977

1978

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Röntgendiagnostik (Direktor: Prof. Dr. Friedhelm Heß) im Radiologiezentrum der Philipps-Universität (Direktoren: Prof.Dr.Dr. E.H.Graul und Prof.Dr.F.Heß)

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS IONISIERENDER STRAHLEN AUF ZELLMEMBRANEN UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER SULFHYDRYLGRUPPEN

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin des hohen Fachbereiches Humanmedizin der Philipps - Universität Marburg

vorgelegt von :

ASTA KLARNER geb. SOMMER

aus Hamburg

Marburg 1977

Angenommen durch den Fachbereich Humanmedizin der
Universität Marburg am 15.12.1978

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan : Prof. Dr. Friedrich Neurath

Referent : Dr. med. habil. Rolf Prignitz

Correferent : Prof. Dr. Friedhelm Heß

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Theorie der Strahlenwirkung	1
1.2.	Membranstrukturbeschaffenheit	3
1.3.	Membranstrukturveränderungen durch Bestrahlung	6
1.3.1.	Proteine	6
1.3.2.	Lipide	9
1.3.3.	Kohlehydrate	1o
1.4.	Die Bedeutung der Sulfhydryl-Gruppen als reaktive Gruppen der Proteine	11
1.5.	Der Wirkungsmechanismus SH-haltiger Strahlenschutzsubstanzen und einige Wirkungen der Strahlenschutzstoffe Cystein und Glutathion auf die Membranpermeabilität	16
1.6.	Beeinflussung von Membranfunktionen	2o
1.7.	Fragestellung der Versuche	23
2.	METHODEN	25
2.1.	Vorbemerkungen	25
2.2.	Darstellung einer mikrosomalen, Mg^{2+}- abhängigen, Na^{+}- und K^{+}- aktivierbaren Adenosintriphosphatase	25
2.3.	Messung der Enzymaktivität	27
2.4.	Methode zur Messung des Sulfhydrylgehaltes	29
2.5.	Bestimmung des Sulfhydrylgehaltes der bestrahlten ATPase- Präparation	3o
2.6.	Messung des SH-Gehaltes bis 24 Stunden nach einer Bestrahlung mit 15oo R	3o

Seite

2.7. Messung der ATPase-Aktivitäten nach Cystein-Zugabe 31

2.8. Messung der ATPase-Aktivitäten nach Glutathion-Zugabe 31

2.9. Materialien 32

2.10. Statistik 32

3. ERGEBNISSE 33

3.1. Abhängigkeit der Strahlenwirkung von der applizierten Strahlendosis 33

3.2. Abhängigkeit des Sulfhydrylgehaltes von der applizierten Strahlendosis 33

3.3. Auswirkungen einer Strahlendosis von 1500 R auf den Sulfhydrylgehalt bis 24 Stunden nach der Bestrahlung 34

3.4. Auswirkungen des Strahlenschutzstoffes Cystein auf die Transport-ATPase-Aktivität 34

3.5. Auswirkungen des Strahlenschutzstoffes Glutathion auf die Transport-ATPase-Aktivität 35

3.6. Tabellen und Abbildung 36

4. DISKUSSION 41

4.1. Strahlensensibilität des Membran-ATPase-Systems 41

4.2. Die Bedeutung der Sulfhydryl-Gruppen für die Hemmung der Transport-ATPase 42

4.3. Schlußbetrachtung 45

5. ZUSAMMENFASSUNG 46

6. LITERATURVERZEICHNIS 48

1. EINLEITUNG

1.1. Theorie der Strahlenwirkung

Die Strahlenschädigungen ionisierender Strahlen können auf verschiedene Weise erfolgen (91):

1) direkt durch α-, β- oder Protonenstrahlen
2) indirekt durch γ- und Röntgenstrahlen, die energiereiche Elektronen aus den Atomen herauslösen
3) durch Neutronen, die durch Wechselwirkung mit Atomkernen Rückstoßprotonen und Isotope erzeugen.

Die Röntgenstrahlen haben erst ab einem Energiegehalt von $E > 10$ keV ionisierende Wirkung (38).

Es ist noch immer nicht hinreichend bekannt, wie der Zusammenhang zwischen der einwirkenden Strahlenenergie und den biologischen Folgezuständen ist. DESSAUER U. A. nahmen an, daß die Strahlenenergie eine direkte Wirkung auf organische Substanzen ausübt. Sie entwickelten die "Treffertheorie", die u. a. besagt, daß die Energie der Strahlen quantenhaft absorbiert und in kleinen Bereichen wirksam wird.
Die biologischen Schäden, die als Folge der energiereichen Strahlung entstehen, werden auf primär dabei auftretende Ionisationen zurückgeführt (91).

Jedoch lassen sich nicht alle Strahlenschäden durch diese direkte Wirkung erklären. Es zeigte sich, daß die Bestrahlung von Wasser zu einer Reihe von Produkten führt, die ihrerseits auf die Biomoleküle einen Einfluß ausüben. Dieser indirekten Strahlenwirkung mißt man heute eine viel größere Bedeutung zu als der direkten. Aus angeregten Wassermolekülen können OH- und H-Radikale entstehen.

$$H_2O \xrightarrow{\text{Strahlung}} H_2O^+ + e^- \quad (1)$$

$$H_2O^+ + H_2O \longrightarrow H^+_{aq} + OH^\cdot \quad (2)$$

$$e^- + H_2O \longrightarrow H_2O^- \quad (3)$$

$$H_2O^- + H_2O \longrightarrow H^\cdot + OH^-_{aq} \quad (4)$$

Nettoumsatz : $H_2O \xrightarrow{\text{Strahlung}} H^{\cdot} + OH^{\cdot}$ 5

(entnommen aus 80)

OH-Radikale wirken stark oxidierend und reagieren vor allem mit einigen Aminosäuren, darunter mit Cystein und Cystin sehr schnell. Das H-Radikal greift SH-, SS- sowie Imidazolgruppen an (91).

Freie Elektronen können aquatisiert werden.

$$e^- + H_2O \longrightarrow e^-_{aq} \qquad 6$$

In diesem Zustand haben sie eine höhere Lebensdauer, sind stabiler, können über längere Distanzen diffundieren und mit gelösten Biomolekülen reagieren (79).

Neben der Bildung von OH- und H-Radikalen sowie aquatisierten Elektronen liefert die Radiolyse des Wassers auch Wasserstoffperoxyd. Seine Bedeutung im Rahmen der Strahlenschädigung der Zellmembran ist, wie unten weiter ausgeführt wird, umstritten.

Die Intensität der Strahlenwirkung ist u. a. abhängig vom Sauerstoffgehalt der Gewebe, vom pH und der Temperatur. Besonders deutlich zeigt sich der Sauerstoffeffekt : Je höher die Sauerstoffkonzentration ist, desto ausgeprägter ist die Wirkung der ionisierenden Strahlen. Bei hohem Sauerstoffpartialdruck werden die ionisierenden Radikale $HO_2^{\cdot}$ und O_2^- gebildet, die sehr stark mit SH-Gruppen reagieren (53). Außerdem verhindert der Sauerstoff, daß SH-Gruppen die gebildeten Radikale abfangen.

$R^{\cdot} + O_2 \longrightarrow RO_2^{\cdot}$ (Fixation)

$R^{\cdot} + RSH \longrightarrow RH + RS^{\cdot}$ (Reparation durch SH-Gruppen)

(92)

1.2. Membranstrukturbeschaffenheit

Die Erforschung der Strukturbeschaffenheit der Zellmembranen hat bis jetzt nur zu Teilergebnissen geführt. So gibt es bis heute eine Reihe von Hypothesen, die durch experimentelle Daten mehr oder weniger gestützt werden können. Im folgenden sollen einige Modelle kurz dargestellt werden.

Das von DAVSON und DANIELLI schon 1935 entwickelte Modell sieht für die Membran eine zentrale Lipid-Doppelschicht vor, bei der die polaren Reste nach außen gerichtet sind und mit Proteinlamellen in Verbindung stehen. Hierbei wurden die Proteine für hydrophil gehalten und sollten nach ROBERTSON in der β-Keratinstruktur vorliegen. Dieses Modell ist aber heute umstritten. Es wurde u. a. wesentlich durch das elektronenoptische Aussehen von Membranen in kontrastierten Präparationen gestützt. Dieses Aussehen besagt aber lediglich, daß die Membran aus einer zentral gelegenen hauptsächlich apolaren Mittelzone und zwei äußeren durch Konzentration von polaren Gruppen elektronendicht dargestellten Schichten besteht. Daraus kann nicht eindeutig auf die molekulare Beschaffenheit der Membran rückgeschlossen werden (89).

Das revidierte WALLACH-ZAHLER-Modell versucht eine Zusammenfassung der meisten bekannten Membraneigenschaften bildlich wiederzugeben. WALLACH und ZAHLER nehmen an, daß die Membran aus Untereinheiten aufgebaut ist, die tangential zur Oberfläche verschieblich sind und deren Achsen im allgemeinen senkrecht zur Membranoberfläche stehen. Die Lipide treten zwar in einer Doppelschicht auf, werden aber - was die spezifische Zusammensetzung und Organisation anbetrifft - von den Proteinen determiniert und zwar um so deutlicher, je näher sie diesen Proteinen lokalisiert sind. Die Proteine können auch die Membran durchdringen. Sie liegen dann vorwiegend in der α-Helix-Struktur vor und die Circumferenz ihrer Untereinheiten ist apolar aufgebaut. Proteine und Lipide treten also im polaren wie im apolaren Bereich miteinander in Verbindung. Die polaren Aminosäurereste befinden sich entweder an der Oberfläche

der Membran oder durchziehen die Membran senkrecht und bauen so möglicherweise hydrophile Kanäle auf, das heißt, bilden Membran - "Poren". Die Durchlässigkeit dieser "Poren" würde dann entscheidend von der Konformation der Proteine abhängen (89).

CHANGEUX U. A. (18) halten die biologische Membran für eine geordnete Ansammlung von globulären Lipoproteineinheiten, sogenannten "Protomeren", die in einem zweidimensionalen kristallinen Gitter organisiert sind. Das Protomer kann mindestens zwei verschiedene Konformationen eingehen. Es besitzt einen Rezeptor für jeden Typ von spezifischen Liganden, der normalerweise an die Membran gebunden werden kann. Die Affinität von einem oder von einigen dieser Rezeptoren zum entsprechenden Liganden wird verändert, wenn sich die Konformation ändert. Die Konformation des Protomers hängt ab von der Bindung zum Nachbarprotomer des Gitters. Dadurch entsteht eine Gitter-Ordnung. In dieses Modell des kooperativen Gitters lassen sich auch die Vorgänge an erregaren Membranen einordnen (19).

In seinem Artikel über die Ultrastruktur biologischer Membranen kommt HENDLER (35), nachdem er eine Reihe von Membranmodellen dargestellt und kritisiert hat, zu der Auffassung, daß es am fruchtbarsten sei, all die Membraneigenschaften, die durch Experimente glaubhaft gemacht worden sind, nebeneinander gelten zu lassen. Er stellt kein neues Modell vor, sondern greift auf die unit-membrane-Hypothese zurück, die er für das am meisten gesicherte Modell hält.
Demnach besteht die Membran aus einer fortlaufenden Lipid-Doppelschicht mit einer äußeren polaren und einer inneren apolaren Region. Diese dreidimensionale Struktur kann durch Proteinporen unterbrochen werden. Sie enthält verschiedene granuläre oder micelläre Einschlüsse, aber bewahrt trotzdem den wesentlichen kontinuierlichen hydrophoben Kern. Auf der Außenseite kann eine Mischung von Proteinkonfigurationen vorliegen : Entweder existiert kein Proteinmantel oder der Pro-

teinmantel besteht aus globulären Proteinen oder aus Proteinen in β - Konfiguration. Die Lipid-Doppelschicht-Membran besitzt gewisse Bereiche, die entweder ständig modifiziert werden oder vorübergehend verändert werden können, um spezifische Funktionen zu erfüllen.

1.3. Membranstrukturveränderungen durch Bestrahlung

1.3.1. Proteine

Bei der Wirkung ionisierender Strahlen auf Zellmembranen kommt den Proteinen besondere Bedeutung zu. Zum einen, weil ein Großteil der Biomembranen zu 60 % aus Proteinen besteht, zum anderen, weil Proteine durch energiereiche Strahlen verändert werden.

Wichtige Orte der Strahlenzerstörung scheinen die α-C-Atome der Polypeptide und die Schwefelatome der Seitenketten von Cystein- oder Cystin-Resten zu sein (31). Das α-C-Atom ist offenbar aufgrund seiner exponierten Lage in der α-Helix besonders angreifbar und kann durch ionisierende Strahlen zu einem freien Radikal werden. Der Schwefel bildet im Protein häufig S-S-Brücken. Diese Brücken sind sehr strahlenempfindlich, so daß durch Bestrahlung freie Schwefel-Radikale entstehen.

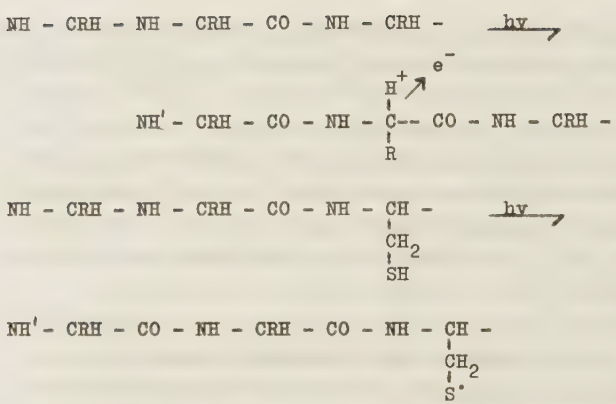
Die Wirkung ionisierender Strahlen auf Proteine läßt sich eindrucksvoll an Enzymen zeigen, da hier die Abnahme der biologischen Wirkung gemessen werden kann. Weiterhin haben es auch neue Techniken der Proteinchemie möglich gemacht, einzelne Aminosäuren und Aminosäurenzusammensetzungen zu bestimmen, sowie Proteine durch Gelfiltration aufgrund ihrer Molekülgröße zu trennen. Unter Einwirkung ionisierender Strahlung fanden sich Änderungen in der Aminosäurezusammensetzung, vor allem ein Abbau der schwefelhaltigen und aromatischen Aminosäuren. Es zeigte sich jedoch, daß diese Veränderungen nicht unbedingt mit einem Aktivitätsverlust des Enzyms einhergehen mußten. Nur bei Veränderungen der Gruppen, die das aktive Zentrum des Enzyms mitbeeinflussen, tritt Inaktivierung ein. Mit einem Aktivitätsverlust verbunden ist hingegen die Molekülaggregation, die nach Bestrahlung von Proteinen in wässriger Lösung beobachtet werden konnte (85). Vermutlich geschieht dies durch den Verlust der globulären Struktur der Proteine.

Die Auswirkungen der Produkte der Wasserradiolyse auf die Enzymaktivierung untersuchten ADAMS u. Mitarb. (1,2) an

Lysozym und Ribonuclease. Sie kamen zu dem Schluß, daß die OH-Radikale der Wasserradiolyse die Inaktivierung der beiden Enzyme zu einem sehr großen Teil verursachen. Zu einem kleinen Prozentsatz ist die Abnahme der biologischen Wirkung der Enzyme auch den H-Radikalen zuzuschreiben, während die aquatisierten Elektronen diesen Effekt nicht zeigten. Diese Elektronen reagieren hingegen ziemlich spezifisch mit Cystein und Cystin, was aber keine Inaktivierung des Enzyms zur Folge hat (13,14,22).

LICHTIN u. Mitarb. (41) untersuchten bei der Ribonuclease, welche Gruppen durch OH-Radikale angegriffen werden. Es zeigte sich, daß die Radikale heftig mit Aminosäuren des Enzyms reagieren und außerdem am α-C-Atom zur Radikalbildung führen. Da die Veränderung der Aminosäurereste keine Inaktivierung zur Folge hat, führt möglicherweise die Bildung der C_α -Radikale zur Inaktivierung und zur Aggregation der Moleküle.

Da die Membranproteine als sogenannte "molekulare Festphasen" aufzufassen sind, spielt hier nicht nur die indirekte Strahlenwirkung durch Produkte der Wasserradiolyse eine Rolle, sondern auch die Auswirkungen der direkten Strahlenwirkung. Die Bestrahlung kann primär zu Ionisation durch Emission von Elektronen führen (91). Dies sei im folgenden für Polypeptide mit und ohne SH-Gruppen schematisch dargestellt:



(entnommen aus 91)

Weil das Protein in der Membran einen strukturellen Bestandteil bildet, darf es bei der Darstellung des Strahlenschadens nicht isoliert betrachtet werden. In einem kooperativen Membrangitter führt die strahleninduzierte Veränderung eines Proteins zu Auswirkungen in der Umgebung des Proteins und beeinflußt damit letztendlich die Membranfunktion.

1.3.2. Lipide

Lipide stellen einen wesentlichen Bestandteil von Membranen dar. Die Doppelbindungen ihrer ungesättigten Fettsäuren werden durch die Bestrahlung entweder direkt oxidiert oder von oxidierenden Radikalen der Wasserradiolyse angegriffen. Auf beiden Wegen entstehen Lipidperoxide, die generell sehr toxisch sind.

WILLS U. MITARB. (96) bestrahlten Zellfraktionen und stellten fest, daß sich während der Inkubation nach der Bestrahlung Lipidperoxide bildeten, wenn Sauerstoff während der Inkubationsphase anwesend war. Malonaldehyd, welches das hauptsächliche Endprodukt der Lipidoxidation darstellt, wurde als Indikator benutzt. Die Entstehung von Malonaldehyd ist vor allem auf den Abbau von ungesättigten Membranphosphatiden zurückzuführen. Da - wie oben erwähnt - die Membranphosphatide in engem Zusammenhang mit den Membranproteinen stehen und sogar deren Konformation beeinflussen können, ist es anzunehmen, daß die Bildung von Malonaldehyd mit einer Änderung der Membranstruktur einhergeht (91).

Unklar ist noch, wann es zur Bildung von Lipidperoxiden in der Membran kommt und wie diese in die strahleninduzierte Membranfunktionsänderung einzureihen sind. Vermutlich werden Lipidperoxide erst dann in größeren Mengen gebildet, wenn alles antioxidativ wirkende Material zerstört ist (Dosen über 50 krad) (44,81). In diesem Fall kann man annehmen, daß erst im Gefolge von Konformationsänderungen der Membranproteine Lipidperoxide entstehen (97). Andererseits wurde in Lysosomen nach Bestrahlung ein Zusammenhang zwischen Lipidperoxidbildung und einem Enzym-Leck der lysosomalen Membran gefunden (95).

1.3.3 Kohlehydrate

An der Oberfläche der Zellmembran befinden sich Kohlehydratgruppen. Sie sind Teile von Glucoproteinen oder Glucolipiden, die mit der Membran assoziiert sind. Die Kohlehydratketten ragen frei in das umgebende wässrige Medium. Sie besitzen eine spezifische Struktur, die der ganzen Zelloberfläche eine Spezifität verleiht (36).

Die Bestrahlung von Zuckern führt zu hoch zytotoxischen α,β - ungesättigten Karbonylen. Die Wirkung auf die Zelle wird durch irreversible 1,4-Addition mit SH-Gruppen hervorgerufen, wodurch stabile Thioester entstehen. Bemerkenswert ist dabei die hohe Reaktionsfähigkeit der ungesättigten Karbonyle, die die Reaktivität von gesättigten Aldehyden mit SH-Gruppen um das 10-fache übersteigt (84). Außerdem können die Karbonyle auch mit den Aminogruppen von Proteinen reagieren und auf diese Weise vielleicht die Membranfunktion beeinflussen.

Weiterhin fand man, daß die Bestrahlung von Mucopolysacchariden zu einer Viskositätsabnahme führt, die mit einem Depolimerisationsprozeß einhergeht (17).

1.4. Die Bedeutung der Sulfhydryl - Gruppen als reaktive Gruppen der Proteine

Wie bereits oben erwähnt, stellen die Sulfhydryl-Gruppen der Proteine Angriffspunkte für ionisierende Strahlen dar. Protein - SH - Gruppen kommen in der Membran zum einen als SH-Gruppen des aktiven Transport-Systems für Natrium- und Kalium-Ionen vor, zum anderen gibt es sie als sogenannte membran-gebundene Sulfhydryl-Gruppen.

Die meisten tierischen und pflanzlichen Zellen besitzen einen hohen intrazellulären K^+/Na^+ - Quotienten, während im extrazellulären Medium Natrium über Kalium dominiert. Zur Aufrechterhaltung dieser Ionenverteilung dienen zwei Mechanismen:

- 1. ein aktives Transportsystem für Kalium- und Natrium-Ionen
- 2. die Permeabilitätsschranke der Membran

ad 1.) Bei dem Transportsystem handelt es sich um einen Lipidprotein-Komplex in der Plasmamembran, der zumindest aus zwei Enzymen, nämlich einem Mg^{++}-abhängigen und einem Na^+- und K^+-aktivierbaren Enzym besteht. Dieser Enzymkomplex hat die Aufgabe, Na- und K-Ionen entgegen dem Konzentrationsgradienten durch die Zellmembran zu transportieren. Die dazu benötigte Energie wird durch Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) bereitgestellt (58,59,77,93). Der durch Natrium- und Kalium-Ionen aktivierbare Teil wird auch Transport-Adenosintriphosphatase (t-ATP) genannt, während der gesamte Enzymkomplex genauer als Mg^{++}-abhängiges, Na^+- und K^+-aktivierbares ATPase - System bezeichnet wird.

Die Bedeutung der SH-Gruppen für dieses System zeigt sich daran, daß SH-blockende Agentien wie N-Äthylmaleimid (NEM) und p-Chlormercuribenzoesäure (PCMB) auch die Aktivität des Enzymkomplexes hemmen (67,76,77,87). Der Mechanismus dieser Hemmung ist noch unbekannt. Zwei Möglichkeiten werden diskutiert: Zum einen können sich Thiole im aktiven Zentrum des Enzyms befinden. Werden sie blockiert, resultiert daraus direkt eine Hemmung der Enzymaktivität. Zum anderen besteht die Möglichkeit, daß die essentiellen SH-Gruppen außerhalb des aktiven Zentrums liegen, daß sie aber für die Aufrechterhaltung der Konformation des Enzyms in einem für die Katalyse optimalen Zustand verantwortlich sind. Werden diese SH-Gruppen blockiert, kommt es zu einer sterischen Konformationsänderung, die einen Aktivitätsverlust zur Folge hat (77,87).

Es stellte sich heraus, daß längst nicht alle SH-Gruppen des Enzymsystems eine Bedeutung für seine Aktivität haben. Nur ein sehr kleiner Teil ist notwendig für die Funktion der ATPase (67,87).

ad 2.) Neben den erwähnten Untersuchungen über die Bedeutung der SH-Gruppen für das aktive Na^+/K^+-Transportsystem gibt es auch Untersuchungen über die Bedeutung der Sulfhydryl-Gruppen der Membranproteine. Bestrahlung von Erythrozyten-Suspensionen bewirkt eine Permeabilitätsänderung für monovalente Kationen. Es wurde zunächst die Hypothese aufgestellt, daß Membran-SH-Gruppen die kritische Größe für diesen Membranschaden darstellen oder daß zumindest einige der SH-Gruppen wichtig sind für die Erhaltung der Resistenz gegen die ansteigende passive Diffusion von Kalium-Ionen (21,49,5o). Hierbei wurde angenommen, daß die Einbeziehung von SH-Gruppen in biologische Funktionen immer mit der Einbeziehung von Proteinen einhergeht (74).

Ionisierende Strahlen führen zu chemischen Veränderungen der SH-Gruppen, indem sie diese oxidieren (48,81,97). Die OH-Radikale stellen dabei das wesentliche Oxidans dar. Dieses wurde durch den starken Schutzeffekt, den der OH-Radikalfänger p-Aminobenzoesäure auf die SH-Gruppen ausübt, nachgewiesen.

Über die Bedeutung von Wasserstoffperoxyd als Oxidans gibt es unterschiedliche Ansichten. Während SUTHERLAND und PIHL (80) feststellen, daß Katalase keinen Schutz auf SH-Gruppen ausübt, und daraus schließen, daß H_2O_2 die SH-Gruppen nicht schädigt, ist RINK (68) der Ansicht, daß das gebildete Wasserstoffperoxyd und auch andere Wasserradikale zur Oxidation der SH-Gruppen beitragen.

Folgende Reaktionen werden für möglich gehalten:

1) $R\text{-}SH + OH^{\cdot} \longrightarrow RS^{\cdot} + H_2O$
2) $R\text{-}SH + HO_2^{\cdot} \longrightarrow RS^{\cdot} + H_2O_2$
3) $2\ R\text{-}SH + H_2O_2 \longrightarrow R\text{-}S\text{-}S\text{-}R + 2\ H_2O$
4) $2\ RS^{\cdot} \longrightarrow R\text{-}S\text{-}S\text{-}R$
5) $R\text{-}S^{\cdot} + O_2 \longrightarrow R\text{-}SO_2^{\cdot}$
6) $R\text{-}S^{\cdot} + OH^{\cdot} \longrightarrow R\text{-}SOH$ (Sulfensäure)
7) $R\text{-}SO_2^{\cdot} + H^{\cdot} \longrightarrow RSO_2H$ (Sulfinsäure)
8) $R\text{-}SO_2^{\cdot} + OH^{\cdot} \longrightarrow R\text{-}SO_3H$ (Sulfonsäure)

(entnommen aus 68)

Die wichtigsten Oxidationsprodukte sind zweifelsohne die Disulfide (81,83,97). Die höheren Oxidationsprodukte der SH-Gruppen wie Sulfen-, Sulfin- und Sulfonsäure scheinen relativ bedeutungslos für die Membranfunktion zu sein (81). RINK (68) hält es für möglich, daß sie die negative Ladungsdichte der Membran erhöhen und damit zu einer größeren Kationenbeweglichkeit führen.

Um die Bedeutung der Membran-SH-Gruppen für die Aufrechterhaltung der Permeabilitätsschranke nachzuweisen, wurde einerseits die Wirkung sulfhydrylblockender Agentien auf die passive Diffusion von Natrium- und Kalium-Ionen untersucht (siehe nächster Abschnitt), andererseits die Strahlenschutzwirkung von SH-haltigen Agentien wie Cystein und Glutathion (siehe Kap. 1.5.).

Viele Autoren nehmen an, daß der Bestrahlungseffekt und der Effekt, den SH-blockende Agentien hervorrufen, auf

dem selben Mechanismus beruht nämlich auf der Zerstörung der Membran-SH-Gruppen. Folgende Experimente werden zum Beweis herangezogen:

Oxidiert man in einer Erythrozyten-Suspension 95 % der gesamten reaktiven SH-Gruppen durch NEM, so wird die Bestrahlungsdosis, die Hämolyse und K^+-Verlust herbeiführt, um den Faktor 3 reduziert (44). In Ehrlich-Aszites-Zellen und HeLa-Zellen läßt sich eine Korrelation zwischen der Wirkung zugegebener NEM-Konzentrationen und Bestrahlungsdosen herstellen (4). SH-blockende Agentien wie p-Hydroxymercuribenzoat (PHMB), Chloromerodrin und NEM bewirken einen Na^+-Anstieg und einen K^+-Verlust der Erythrozyten und haben somit denselben Effekt wie ionisierende Strahlen. Die Wirkung der SH-blockenden Agentien PHMB, p-Chlormercuribenzensulfonat (PCMBS) und PCMB auf die Permeabilität von Na^+ und K^+ ist sogar bis zu einer Grenzdosis additiv zur Bestrahlungswirkung (69,72,73,83).

Eine Abnahme des Thiolgehaltes von Membranen nach Bestrahlung konnte gemessen (68,81,83,97) und teilweise auf eine Oxidation zu Disulfiden zurückgeführt werden (83). Vermutlich führt die Destruktion der Membran-SH-Gruppen zu einer Veränderung der Tertiärstruktur der Proteine, die ihrerseits eine Membranstrukturveränderung induziert, deren Folge eine Permeabilitätsänderung für K^+ und Na^+ ist (68,73,83,97).

Nicht alle Membran-SH-Gruppen sind für diesen Effekt verantwortlich. Durch Untersuchungen mit SH-blockenden Agentien wurde versucht, die Thiole nach ihrer Strahlensensibilität zu unterteilen (4,75,82) und ihre Lokalisation zu ermitteln. Allgemein wird angenommen, daß die strahlensensible Gruppe der Thiole, die eine Bedeutung für die Kationenpermeabilität hat, sich auf der äußeren Oberfläche der Membran befindet (37,72,73, 75,83). Diese Ansicht ist allerdings nicht unumstritten. Andere Autoren lokalisieren die SH-Gruppen nicht auf der Außenseite der Membran, sondern im Membraninneren (12,82) oder an der zytoplasmatischen Seite der Membran (91).

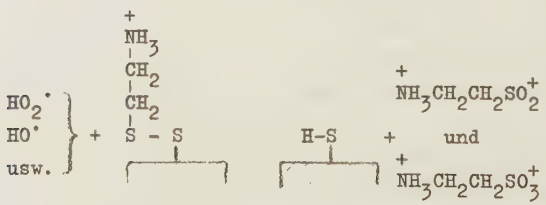
Da der Bestrahlungseffekt auch mit dem Effekt anderer Substanzen, die die Membranlipoproteinstruktur zerstören wie

z. B. Lysolecithin additiv ist, wird von einigen Autoren die Ansicht vertreten, daß die Oxidation von Membranthiolen nicht allein wesentlich für die Strahlenwirkung ist. Auch die Veränderung der Lipoproteinstruktur, die durch die Oxidation und durch andere Reaktionen - wie u. a. durch die Spaltung von Disulfidbindungen der Proteine - herbeigeführt wird, hat Bedeutung (43,45).

1.5. Der Wirkungsmechanismus SH-haltiger Strahlenschutzsubstanzen und einige Wirkungen der Strahlenschutzstoffe Cystein und Glutathion auf die Membranpermeabilität

Da die Sulfhydrylgruppen der Proteine einen wichtigen Angriffspunkt für ionisierende Strahlen bilden, ist die Frage zu stellen, ob es SH-haltige Substanzen gibt, die durch Interaktion mit den Proteinthiolen einen Schutzeffekt ausüben. Es sind tatsächlich eine Reihe solcher Substanzen gefunden worden. Über ihre vermutliche Wirkungsweise soll im Folgenden berichtet werden.

Die im Zusammenhang mit dieser Arbeit bedeutsamste Theorie ist die auf ELDJARN und PIHL zurückgehende Theorie des Mechanismus gemischter Disulfide (24). Die SH-Gruppen eines Schutzstoffes der Cystein-Cysteamin-Gruppe - zu dieser Gruppe gehört auch Glutathion - verbindet sich mit dem Proteinthiol zu einem Disulfid. Wird diese Bindung durch freie Radikale der Wasserradiolyse angegriffen, so wird ein S-Atom zu Sulfin- oder Sulfonsäure oxidiert, während das andere zur SH-Gruppe reduziert wird. So wird das angegriffene Schwefelatom in dem Maße geschützt, wie es wieder zu einer funktionellen SH-Gruppe reduziert wird.



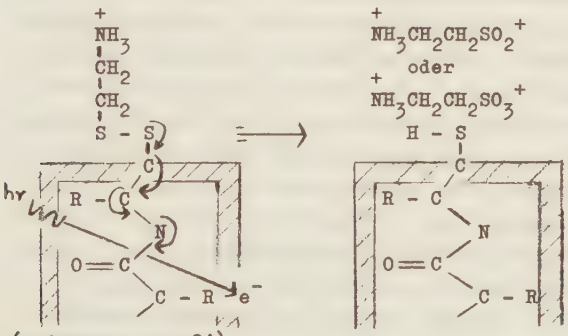
(entnommen aus 24)

Ähnlich soll Glutathion wirken, wenn es nach der Bestrahlung zugegeben wird. Das reduzierte Glutathion (GSH) reagiert dann mit Protein-Disulfidbrücken, die durch die Strahlenoxidation entstanden sind, und führt diese teilweise in den Ausgangszustand zurück.

$$R\text{-}S\text{-}S\text{-}R \;+\; GSH \rightleftharpoons G\text{-}S\text{-}S\text{-}R \;+\; R\text{-}SH$$

(entnommen aus 68).

Es wird vermutet, daß die Disulfide auch einen gewissen Schutz gegen die direkte Strahlenwirkung ausüben. Wenn durch die Strahlenenergie ein Elektron aus dem Protein herausgeschlagen wird, kann die entstandene Lücke schnell durch ein Elektron gefüllt werden, das von der Disulfidbindung stammt. Dabei wird das Protein geschützt und das Proteinthiol wieder hergestellt.



(entnommen aus 24)

Die Bildung gemischter Disulfide wird von vielen Autoren zur Deutung von Strahlenschutzeffekten SH-haltiger Substanzen angeführt (6,7,26,65,66).

Ein weiterer Wirkungsmechanismus ist der sogenannte Radikalfang. Man stellt sich vor, daß die SH-Gruppen der Schutzsubstanzen mit den zellulären Thiolen um die Radikale der Wasserradiolyse konkurrieren. Sie fangen die Radikale ab und werden dabei oxidiert. Auch auf diesen Mechanismus beruft sich eine Reihe von Autoren (33,34,37,69,73,78).

Andere Vorstellungen zum Wirkungsmechanismus sollen hier nur kurz angedeutet werden. Es gibt die Theorie des "biochemischen Schocks". Er stellt einen Zustand von verminderter Enzymaktivität, beschleunigter Abgabe von Glykogen, Freisetzung von Enzymen u. a. dar. Teilweise wird vermutet, daß er durch die Bildung gemischter Disulfide von SH-Körpern mit SH-haltigen zellulären Substanzen herbeigeführt wird. Dieser Zustand soll mit einer temporär erhöhten Resistenz gegen ionisierende Strahlen einhergehen (6,7,26,78).

Auf eine verminderte Sauerstoffspannung führt PATT (51) den Strahlenschutzeffekt von Cystein zurück.

LANGENDORFF räumt der Adenylcyclase eine Schlüsselrolle ein. Er nimmt an, daß applizierte SH-Körper mit spezifischen Rezeptoren, die sich an der Oberfläche von biologischen Membranen befinden, reagieren. Es kommt zu einer reversiblen Komplexbildung, wodurch strahlenempfindliche Rezeptorgruppen vor Wasserradiolyseprodukten geschützt werden. Gleichzeitig führt diese Komplexbildung zur Aktivierung der Rezeptoren. Da die Rezeptoren regulatorische Untereinheiten des in der Membran gebundenen Adenylcyclase-Systems sind, führt die Aktivierung zur Stimulierung der Adenylcyclase, was wiederum die Entstehung von cyclischem Adenosinmonophosphat (AMP) und Pyrophosphat aus ATP bedeutet. Das AMP bewirkt schließlich eine Normalisierung der verschiedenen strahlenbedingten Regulationsstörungen durch Bildung aktivierter Verbindungen (39,40).

Wie bereits erwähnt, bewirken ionisierende Strahlen und SH-blockende Agentien eine Permeabilitätsänderung der Plasmamembran für Natrium- und Kalium-Ionen. Wie wird nun diese Permeabilitätsänderung durch SH-haltige Strahlenschutzstoffe wie Cystein und Glutathion beeinflußt?

Sowohl Cystein, das permeabel ist, als auch reduziertes Glutathion (GSH), das nicht in die Zellen eindringt, schützen - vor der Bestrahlung zugegeben - Erythrozyten gegen den strahleninduzierten Anstieg der Na^+-Aufnahme (73). Die Rb^+-Aufnahme in rote Blutkörperchen wird durch PCMBS gehemmt. Diese Hemmung kann größtenteils durch Cystein aufgehoben wer-

den (67). Die Na^+-Aufnahme von Erythrozyten kann durch PCMBS ähnlich wie nach Bestrahlung erhöht werden. Durch Behandlung mit GSH wird ein kleiner Prozentsatz von PCMBS gelöst und dadurch die Natriumionen-Permeabilität fast vollständig repariert (72,75). PCMBS und Bestrahlung haben einen additiven Effekt auf den K^+-Verlust menschlicher Erythrozyten. Dagegen zeigt sich ein "subtraktiver Effekt" von Cystein: Cystein kann den PCMBS-Effekt rückgängig machen und den K^+-Verlust auf einen Level bringen, der quantitativ vergleichbar ist mit dem der Zellen, die nur bestrahlt wurden (83). Ähnliches wird von GSH berichtet. Reduziertes Glutathion kann den PHMB-Effekt auf die Na^+-Aufnahme von Erythrozyten rückgängig machen, aber nicht den Bestrahlungseffekt (73).

Somit kann festgestellt werden, daß diese Strahlenschutzstoffe einen Effekt auf die Membrandurchgängigkeit haben.

1.6. Beeinflussung von Membranfunktionen

Neben der Veränderung für Natrium- und Kalium-Ionen steigt auch die Caesium- und Rubidium-Ionen-Permeabilität nach Bestrahlung an. Jedoch zeigte sich an Erythrozyten, daß zweiwertige Kationen wie Calcium und Strontium, größere Kationen wie Cholin oder zweiwertige Anionen wie Chromat und Phosphat die Membran nicht vermehrt passieren können (72,83). Allerdings wurde am Herzmuskel eine vermehrte Ca^{++}-Aufnahme nach Bestrahlung registriert (60). Deshalb ist die Annahme, daß die Permeabilitätsveränderung der Membran für monovalente Kationen spezifisch sei, nur eingeschränkt gültig.

Über den Glucose-Transport besteht noch Uneinigkeit. Während einige Autoren keine Veränderung der Glucose-Aufnahme durch Bestrahlung fanden (72,83), beobachteten andere, daß Bestrahlung von Erythrozyten in einem hypotonen glucosehaltigen Medium zu einer vermehrten Glucose- und Flüssigkeitsaufnahme führte (47,52). VAN STEVENICK u. a. (88) behandelten rote Blutkörperchen mit SH-blockenden Agentien. Diese Substanzen bewirkten eine Hemmung der Glucose-Aufnahme in die Zellen. Gedeutet wurde der Vorgang als Folge der Bindung eines kleinen Teils von SH-Gruppen der Außenseite der Membran.

Bestrahlt man Erythrozyten mit einer genügend hohen Dosis ionisierender Strahlen, so kommt es zur Hämolyse. Diese Hämolyse hängt offenbar von zwei Faktoren ab: Zum einen führt die veränderte Permeabilität für Natrium-Ionen zu einem fortschreitenden Eintritt dieses Kations in die Zelle. Dieser Vorgang wird vom Wassereintritt begleitet. Es kommt zur Zellschwellung und schließlich zur Ruptur (37). Zum anderen werden während der Inkubation nach der Bestrahlung Lipidperoxide gebildet und die Lipidantioxidantien werden durch strahleninduzierte Produkte in der Extrazellulärflüssigkeit zerstört. Die Folge ist eine Erweichung der Membran, die die Hämolyse begünstigt (43).

Strahleninduzierte Veränderungen stellen sich nicht nur an der Plasmamembran ein. WILLS (94) fand, daß Bestrah-

lung von Mitochondrienmembranen zu einem K^+- und Ca^{++}-Leck führt. - Bestrahlt man Ratten-Leber-Lysosomen, so kann man ab einer Dosis von 1000 rad ein Austreten der Enzyme saure Phosphatase, Kathepsin und β-Glucuronidase beobachten. Zugleich findet eine Lipidperoxidbildung in den Lysosomen statt. Es wird vermutet, daß die Lipidperoxide die Ruptur der Lysosomenmembran bewirken und so den Austritt der hydrolytischen Enzyme ermöglichen (95). Eine Ganzkörperbestrahlung führt bei Mäusen zu einer erhöhten Permeabilität der lysosomalen Membranen in Milz und Thymus. Ebenso beobachtete man eine erhöhte Aktivität der sauren Phosphatase in diesen Geweben (3).

Interessant sind die Untersuchungen der Strahlenwirkung auf erregbare Gewebe, da man, wenn auch hier die Natrium- und Kalium-Permeabilität verändert wird, eine Auswirkung auf Größen wie das Membranpotential, Muskelverkürzung, Relaxationszeit und andere erwarten kann. Tatsächlich zeigt sich bei Bestrahlung von Froschmuskeln in genügend hoher Dosis eine Senkung des Membranpotentials, die mit einem erhöhten K^+-Ausstrom und Na^+-Einstrom einhergeht (9,11,54,55,56,98). Bei verlängerter Relaxationszeit und schnellerer Ermüdbarkeit fand man einen erniedrigten Gesamtgehalt an energiereichen Phosphaten aber einen erhöhten Sauerstoffverbrauch und erhöhte Enzymaktivitäten (10,57). Man kann diese Daten als vergebliche Versuche des Stoffwechsels, den Strahlenschaden zu kompensieren, interpretieren (10,11). An Herzzellen wurden neben einem erhöhten Kaliumausstrom und einer erniedrigten Kaliumaufnahme auch Veränderungen im Einzelablauf des Aktionspotentials wie eine verlängerte Repolarisationsphase und eine Störung der elektromechanischen Koppelung beobachtet (86).

Auch an neuralen Geweben zeigt sich nach Bestrahlung eine erhöhte Na^+- und K^+-Permeabilität und eine Abnahme des Membranpotentials (23,32,70). Energiereiche Strahlen sollen primär die Erholungsprozesse der neuralen Membran beeinflussen. Dies äußert sich in der besonderen Strahlensensibilität der relativen Refraktärperiode (30).

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde deutlich, daß die Strahlen keine direkte Wirkung etwa im Sinne einer frühen direkten Zerstörung des kontraktilen Apparates des Muskels oder einer unmittelbar erregungsauslösenden Wirkung auf erregbare Gewebe haben, sondern daß ihre Wirkung über die Beeinflussung der Membranpermeabilität abläuft (8,57).

1.7. Fragestellung der Versuche

Besonders häufig wurden die strahleninduzierten Elektrolytverschiebungen in Erythrozyten untersucht. Als Ursachen fand man sowohl einen Anstieg des passiven Ionenflusses durch die Membran als auch eine Hemmung des aktiven Transportes. Dabei wurde beiden Mechanismen eine unterschiedliche Bedeutung zugemessen.

Während einige Autoren in der Hemmung des aktiven Transportes die Hauptursache für die Na/K-Ionen-Verschiebung sehen (15,16), halten andere die erhöhte passive Kationenpermeabilität für wichtiger (83). Darunter gibt es sogar einige, die keine Hemmung des aktiven Transportes feststellen (46), sondern den aktiven Transport als Reparaturmechanismus gegen den Strahlenschaden ansehen (12,44).

An Thymozyten fanden CHAPMAN und STURROCK (20) einen Abfall des intrazellulären Kaliumionen-Gehaltes, den sie bei Bestrahlungsdosen von 2oo - 4ooo rad hauptsächlich auf eine Hemmung des aktiven Transports und bei Dosen von 12.ooo - 2o.ooo rad vor allem auf eine erhöhte Membranpermeabilität zurückführten.

PRIGNITZ U. MITARB. (61) fanden nach in vivo-Bestrahlung mit 25o bis 3ooo R eine Hemmung der Transport-ATPase. Sie führten die veränderten Elektrolytverhältnisse an der Membran zumindest teilweise auf diese Hemmung zurück. Nun werden aber durch eine in-vivo-Bestrahlung nicht nur einzelne Enzyme beeinflußt, sondern der gesamte Organismus. Unter anderem fand man nach in-vivo-Bestrahlung eine ansteigende Permeabilität lysosomaler Membranen mit einem Anstieg der sauren Phosphatase-Aktivität (3), einen Abfall des reduzierten Glutathions im Blut begleitet von einem Anstieg in der Leber (64) oder einen Anstieg der Glutathion-Reduktase-Aktivität (71). Es bestände also die Möglichkeit, daß die beobachtete Hemmung der t-ATPase ein sekundärer Vorgang ist, der durch irgendwelche unbekannten primären strahlenbedingten Veränderungen verursacht wird.

In dieser Arbeit wird deshalb das Enzym in vitro bestrahlt. Dabei soll untersucht werden, ob die Sulfhydryl-Gruppen eine Rolle bei der Enzymhemmung spielen.

2. METHODEN

2.1. Vorbemerkungen

Die hier zu untersuchende ATPase ist ein Enzym der Plasmamembran (5,77) und läßt sich in der Mikrosomenfraktion homogenisierter Zellen nachweisen. In dieser Fraktion befinden sich immer auch Mitochondrienfragmente (5). Da Mitochondrien eine ATPase besitzen, deren Eigenschaften sich von denen der gesuchten ATPase zum Teil stark unterscheiden (58,59), wurde ein Verfahren gewählt, daß einen möglichst hohen Grad an Mitochondrienfreiheit gewährleistet. Ein solches Verfahren ist 197o von FRICKE und 1971 von FRICKE und KLAUS beschrieben worden (27,28). Das Mitochondrienindikatorenzym Succinatdehydrogenase besitzt in der nach dieser Methode hergestellten Mikrosomenfraktion nur etwa 8 % der Aktivität, die in einer Mitochondrienfraktion herrscht. Außerdem ist der Quotient aus den Aktivitäten des Na^+- und K^+-aktivierbaren Enzyms und des Mg^{++}-abhängigen Enzyms mit o,65 bzw. 0,8o nach 22 Tagen Alterung der Präparation verhältnismäßig günstig.

2.2. Darstellung einer mikrosomalen, Mg^{2+}-abhängigen, Na^+- und K^+-aktivierbaren Adenosintriphosphatase

Als Versuchstiere dienten weibliche Meerschweinchen mit einem Körpergewicht zwischen 3oo und 6oo g. Das durchschnittliche Herzgewicht nach Säuberung betrug o,8 g. Die Schwankungsbreite lag mit o,1 g relativ niedrig.

Nach Tötung der Tiere durch einen Nackenschlag wurden die Herzen sofort entnommen und in flüssiger Luft eingefroren. Nach einer Lagerzeit von 2o - 24 h bei - 2o °C wurden sie in Zimmertemperatur aufgetaut.
Das Bindgewebe, größere Gefäße und die Vorhöfe wurden entfernt, die Ventrikel aufgeschnitten und vorsichtig mit Filterpapier ausgetupft. Das Feuchtgewicht wurde bestimmt. Anschließend wurden die Präparate in eiskalte Saccharose - EDTA - Lösung (Bestandteile in mMol/l : Saccharose 25o; Di-Na-EDTA 2; mit Tris-

lauge auf pH 7,o eingestellt) gegeben und im Ultra-Turrax (Typ TP 18-1o) 1 Minute lang homogenisiert. Durch eine Verdünnung des Homogenats mit der kalten Saccharose - EDTA - Lösung wurde ein 1o %iges (W/V) bezogen auf das Feuchtgewicht hergestellt. Im folgenden wurde durch ein Eisbad eine Temperatur von +4 °C eingehalten. Das Homogenat wurde in einem Handhomogenisator aus Glas (Fa. KOBE, Marburg) 2 Minuten homogenisiert und anschliessend durch Filtration durch eine zweifache Mullschicht von groben Rückständen befreit.

Anschließend wurden folgende Zentrifugationsschritte in einer kühlbaren (+4 °C) Zentrifuge vom Typ MSE "Highspeed 18", Rotor 6 x 1oo ml nach FRICKE (27,28) durchgeführt:

1. Filtriertes Handhomogenat 1o min bei
   3 ooo Upm = 6oo x g
2. Im Handhomogenisator aufhomogenisierte und mit eiskalter Saccharose - EDTA - Lösung auf gleiches Volumen wie in 1. (ca. 2oo ml) gebrachte Rückstände 11o min bei
   3 ooo Upm = 6oo x g

Schritt 1. und 2. dienten der Abtrennung der Kernmembranfraktion.

3. Überstände 1 und 2, vereinigt und auf 32o ml verdünnt, 5 min bei
   8 3oo Upm = 8 ooo x g

Hier erfolgt die Sedimentation der Mitochondrien.

4. Überstand 3, verdünnt auf 32o ml, 6o min bei
   17 ooo Upm = 34 ooo x g

Bei dieser letzten Zentrifugation sedimentierten die Mikrosomen.

Die Zentrifugationszeiten wurden ab Erreichen der geforderten Umdrehungszahl gerechnet.

Der Rückstand der 4. Zentrifugation wurde wieder mit Saccharose - EDTA - Lösung, pH 7,o, auf 32o ml verdünnt und zur besseren Suspendierung im Handhomogenisator kurz auf-

homogenisiert. Die Proteinkonzentration dieser Suspension wurde mit der Biuret-Methode gemessen und anschließend mit der Saccharose - EDTA - Lösung auf 5 mg Protein/ml eingestellt. Danach wurde das Präparat für 6 Tage bei -2 °C im Kühlschrank gehalten, um einen höheren Aktivitätsquotienten (s. S. 25) zu erreichen (27). Anschließend wurden die Proben in Kunststoffbehältern zu je 1 ml abgefüllt und bei -15 °C eingefroren. Bei dieser Temperatur können sie nach FRICKE (27) bis zu 3 Monaten ohne Aktivitätsverlust gehalten werden.

2.3. Messung der Enzymaktivität

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte auch nach der von FRICKE (27,28) beschriebenen Methode. Dabei wurde über den Substratumsatz

$$ATP \xrightarrow{E} ADP + P_i$$

das anfallende anorganische Substrat P_i gemessen.
Die bei der Reaktion

$$ADP \xrightarrow{E} AMP + P_i$$

entstehenden Phosphatmengen konnten vernachlässigt werden, da sie als sehr gering angegeben werden (92).

Um die beiden beschriebenen Enzyme des ATP-ase-Systems zu bestimmen, wurden zwei Ansätze gemacht:

1. Messung der Aktivität in Anwesenheit von Na^+-, K^+- und Mg^{++}-Ionen. Diese Aktivität wird "Gesamtaktivität" genannt.
2. Messung der Aktivität nur in Anwesenheit von Mg^{++}-Ionen. Diese Aktivität wird "Basalaktivität" genannt.

Aus der Differenz der beiden ergibt sich die Aktivität des nur durch Na^+- und K^+-Ionen aktivierbaren Enzyms, das wie oben erwähnt Transport-ATPase genannt wird.

Das Medium, in dem die Gesamtaktivität bestimmt wurde, enthielt folgende Substanzen:

2 mMol/l $MgCl_2$
8o mMol/l NaCl
16 mMol/l KCl
8o mMol/l Imidazol - HCl - Puffer, pH 7,1
Proteinkonzentration 5o µg/ml
Gesamtvolumen o,5 ml

Die Basalaktivität wurde im gleichen Medium bestimmt; jedoch fehlten die Na^+- und K^+- Ionen.

Die Reaktion wurde mit 5o µl Tris- ATP gestartet. Dabei ergab sich eine ATP-Endkonzentration von 2 mMol/l im Medium. Nach einer 2ominütigen Inkubation im Wasserbad bei 37 °C wurde die Umsetzung mit 2 ml 5%iger Trichloressigsäure (TCA) beendet.

Das anorganische Phosphat wurde nach der Methode von MARSH (42) photometrisch gemessen. Die mit einer P_i-Standard bestimmte Eichkurve verlief in dem für unsere Versuche relevanten Bereich linear. Für den Konzentrationsbereich von o,5-15 µg P_i/ml ergab sich ein Korrelationskoeffizient zwischen P_i-Konzentration und gemessener Extinktion von r = o,993. Die in µg P_i/ml erhaltenen Werte wurden in µMol PO_4/mg Protein/h umgerechnet.

Um die Phosphatanteile, die nicht durch Enzymumsetzung entstanden, zu eliminieren, wurden bei jeder Bestimmung für Basal- und Gesamtaktivität zwei Blindwerte mitgeführt. Sie hatten folgende Zusammensetzung:

Blindwert I :
Reagentien + Enzym ohne ATP
Blindwert II :
Reagentien ohne Enzym mit ATP

Die hierbei bestimmten P_i-Werte wurden von den entsprechenden der Versuchsansätze substrahiert.

2.4. Methode zur Messung des Sulfhydrylgehaltes

Die Bestimmung des Sulfhydrylgehaltes der Enzympräparation wurde nach der von ELLMAN 1958 beschriebenen Methode (25) durchgeführt. Diese Methode beruht darauf, daß das sogenannte Ellman-Reagenz mit dem Thiol reagiert und zur Bildung eines farbigen Anions führt. Aus der im Photometer meßbaren Farbintensität ist die Konzentration dieses Anions bestimmbar. Sie entspricht der Konzentration des ursprünglich vorhandenen Thiols.

Ellman's Reagenz besteht aus einem bei pH 8 wasserlöslichen aromatischen Disulfid [5,5'-dithiobis (2-nitro-benzoic-acid)] , auch abgekürzt als DTNB.

Zur Herstellung der Reagenzlösung wurden 39,6 mg DTNB in 1o ml Phosphatpuffer (o,1 molar, pH= 7,o) gelöst.

Der Bestimmungsansatz bestand aus :

3,o ml Probe
+ 2,o ml Phosphatpuffer (pH 8)
+ 5,o ml Aqua bidest.

Diesem Ansatz wurden 3 ml entnommen.

Die Probe bestand aus loo µl Enzymlösung auf 3 ml Aqua bidest. Die Enzymlösung stammte aus der oben beschriebenen Präparation (siehe Kap. 2.2.). Es wurden jeweils Leerwerte mitgeführt, bei denen die 3 ml Probe durch 3 ml Aqua bidest. ersetzt wurden.

Alle Messungen wurden im BECKMANN-Photometer bei einer Wellenlänge von 42o nm durchgeführt.

Zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten ε wurden bekannte molare Lösungen von Glutathion verwandt. Er errechnete sich aus der Gleichung

$$\varepsilon = \frac{A \cdot D}{C}$$

A = Absorption bei 42o nm
D = Verdünnungsfaktor
C = Konzentration des Thiols

2.5. Bestimmung des Sulfhydrylgehaltes der bestrahlten ATPase - Präparation

Die aus dem Bestimmungsansatz gewonnenen 3 ml Lösung wurden mittels eines Röntgengerätes (Typ Müller RT 100) mit 25o R, 5oo R, 1ooo R, 15oo R, 2ooo R, 25oo R und 3ooo R wirksamer Dosis bestrahlt. 3o Minuten nach der Bestrahlung wurde zu jeder Probe 2o µl Ellman's Reagenz - Lösung gegeben. Die Messung der Extinktion erfolgte nach weiteren 3o Minuten im Photometer gegen den Leerwert. Die Bestimmung des Sulfhydrylgehaltes ergab sich aus folgender Gleichung :

$$C = \frac{A}{\varepsilon} \cdot D$$

entspricht

$$C = \frac{A}{12512} \cdot \frac{1o}{3} \cdot \frac{3,o2}{3,oo}$$

2.6. Messung des SH-Gehaltes bis 24 Stunden nach einer Bestrahlung mit 15oo R

2o µl Ellman's Reagenz - Lösung wurde jeweils 3o min., 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 15 h und 24 h nach einer Bestrahlung mit 15oo R wirksamer Dosis zugegeben.
Die Messung im Photometer erfolgte 3o Minuten nach der Reagenz-Zugabe. Die Sulfhydrylkonzentration errechnete sich wie oben angegeben.

2.7. Messung der ATPase-Aktivitäten nach Cystein-Zugabe

Der ATPase-Präparation wurde jeweils 5 µl L-(+)Cystein zugefügt.

In einer ersten Versuchsreihe wurde das Cystein in 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} und 10^{-7} molaren Konzentrationen verabreicht und anschließend die Gesamt- und Basalaktivität wie oben beschrieben (2.3.) gemessen.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde Cystein in 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} und 10^{-7} molarer Konzentration zu den Enzympräparationen gegeben. Dann wurden die Proben mit einer wirksamen Dosis von 1500 R bestrahlt. Es folgte die Messung der Gesamt- und Basalaktivitäten. Aus diesen errechnete sich die Aktivität der t-ATPase.

2.8. Messung der ATPase-Aktivitäten nach Glutathion-Zugabe

Glutathion wurde in 10^{-2}, 10^{-3} und 10^{-4} molarer Konzentration verwandt.

Drei Versuchsreihen wurden erstellt :

a) Zugabe von jeweils 5 µl Glutathionlösung der drei Konzentrationen zur ATPase-Präparation. Anschliessend Messung der Gesamt- und Basalaktivitäten.
b) Zugabe von jeweils 5 µl Glutathionlösung der drei Konzentrationen zur ATPase-Präparation. Danach Bestrahlung mit 1500 R wirksamer Dosis. Anschließend Messung der Enzymaktivitäten.
c) Bestrahlung von Enzympräparation-Proben mit 1500 R wirksamer Dosis. Nach 1 Stunde Zugabe von jeweils 5 µl Glutathionlösung der drei Konzentrationen. Anschließend Messung der Enzymaktivitäten.

Aus den Gesamt- und Basalaktivitäten wurden wiederum die t-ATPase-Aktivitäten errechnet.

2.9. Materialien

Die zur pH-Einstellung der Saccharose-EDTA-Lösung verwandte Tris-Lauge wurde mit Trisma-Base (SIGMA Nr. T 1503) angesetzt. Das Tris-ATP wurde ebenfalls von SIGMA (Nr. A 3877) bezogen. Die Proteinbestimmung nach der Biuret-Methode wurde mit der BIOCHEMICA-Test-Kombination Nr. 15899 ("Gesamteiweiß") der Fa. BOEHRINGER, Mannheim durchgeführt. Als Phosphatstandardlösung zur Eichkurvenaufnahme der Phosphorbestimmung nach MARSH (42) verwandten wir die BIOCHEMICA-Test-Kombination Nr. 15620 ("Phosphor und Phosphatide im Serum und Urin").
Zur SH-Gruppen-Bestimmung verwandten wir das Ellman-Reagenz der Fa. MERCK, Darmstadt : 2,2'-Dinitro-5,5'-dithiobenzoesäure (Art. 3291 LAB). Außerdem bezogen wir von derselben Firma L(+)-Cystein (Art. 2838 LAB) und reduziertes Glutathion (Art. 4090).

2.10. Statistik

Die Werte in der Abbildung und den Tabellen wurden als Mittelwerte $\pm$ mittlere Abweichung angegeben ($x \pm sx$). Zur statistischen Auswertung führten wir einen paarweisen Mittelwertvergleich mit Hilfe des homogenen t-Testes durch. Die Variablen können als normalverteilt gelten. Die entsprechenden p-Niveaus, auf denen gerade noch Signifikanz zu finden war, wurden in den Tabellen angeführt. Als Vertrauensgrenze für einen signifikanten Unterschied wurde $p < 0{,}05$ angenommen. Die Unterschreitung dieser Grenze ist durch 'n.s.' (nicht signifikant) gekennzeichnet worden.

3. ERGEBNISSE

3.1. Abhängigkeit der Strahlenwirkung von der applizierten Strahlendosis

Mißt man die Gesamtaktivität und die Basalaktivität der Mg^{2+}-abhängigen, Na^{+}- und K^{+}-aktivierbaren ATPase 3o Minuten nach in-vitro-Bestrahlung, so zeigt sich, daß die Transport-ATPase dosisabhängig gehemmt wird (Abb. 1).
Bereits nach einer Strahlendosis von 25o R stellt man einen Aktivitätsverlust fest. Eine Dosis von 25oo R bewirkt eine maximale Hemmung. Bei dieser Dosis wird eine Aktivitätsminderung von ca. 7o % erreicht. Eine weitere Dosissteigerung bringt keinen zusätzlichen Effekt.

3.2. Abhängigkeit des Sulfhydrylgehaltes von der applizierten Strahlendosis

Beim Vergleich des Sulfhydrylgehaltes der bestrahlten ATPase-Präparation mit dem der unbestrahlten Kontrollen kann man keine Dosisabhängigkeit feststellen (Tabelle 1). Jedoch ist - wenn man von den Strahlendosen 25o R und looo R absieht - der SH-Gehalt der bestrahlten Proben signifikant niedriger als der der unbestrahlten (Signifikanzniveau $p < o,oo5$).

3.3. Auswirkungen einer Strahlendosis von 1500 R auf den Sulfhydrylgehalt bis 24 Stunden nach der Bestrahlung

Um beurteilen zu können, wie sich die Bestrahlung längerfristig auf den Sulfhydrylgehalt des ATPase-Systems auswirkt, wurden die SH-Gruppen nach Bestrahlung mit 1500 R bis zu 24 Stunden p.r. untersucht (Tabelle 2). Der Sulfhydrylgehalt aller bestrahlten Präparationen liegt unter dem der unbestrahlten Kontrollen. Wenn sich auch keine deutliche Zeitabhängigkeit zeigt, so findet man doch ein Minimum nach 2 Stunden und einen darauf folgenden Wiederanstieg des SH-Gehaltes. Nach 15 Stunden ist er so weit gestiegen, daß der Unterschied zwar noch immer signifikant ist, sich aber das Signifikanzniveau von $p < 0{,}0005$ auf $p < 0{,}0025$ verändert hat. Nach 24 Stunden ist das Signifikanzniveau auf $p < 0{,}01$ angestiegen.

3.4. Auswirkungen des Strahlenschutzstoffes Cystein auf die Transport-ATPase-Aktivität

Gibt man Cystein in verschiedenen Konzentrationen (10^{-3} bis 10^{-7}) zur ATPase-Präparation und mißt dann die ATPase-Aktivitäten, so stellt man eine starke Enzymhemmung fest (Tabelle 3). Die Auswirkungen hoher Cysteinkonzentrationen (10^{-3} und 10^{-4}) auf die Enzymaktivität sind noch grösser als die einer Bestrahlung mit 1500 R.

Ebenso zeigt sich ein starker Aktivitätsverlust der t-ATPase, wenn man Cystein zugibt und anschließend bestrahlt.

3.5. Auswirkungen des Strahlenschutzstoffes Glutathion auf die Transport-ATPase-Aktivität

Auch red. Glutathion führt zu einer Enzymhemmung, die aber - im Gegensatz zu Cystein - bei niedrigen Konzentrationen ausgeprägter ist (Tabelle 4).
Die t-ATPase-Aktivität der Probe, der Glutathion in einer Konzentration von lo^{-2} zugefügt wurde, liegt sogar über der der unbehandelten Kontrollen, so daß man bei dieser Konzentration eine geringe aktivierende Wirkung des Glutathions annehmen kann.

Gibt man Glutathion zu und bestrahlt anschließend mit 1500 R, so wird die t-ATPase gehemmt. Dabei liegen die Aktivitäten bei allen GSH-Konzentrationen unter denen der nur mit Glutathion behandelten Proben.

Wenn Glutathion 1 Stunde nach der Bestrahlung zugefügt wird, zeigt sich eine noch stärkere Hemmung der Transport-ATPase-Aktivität.

3.6. Tabellen und Abbildung

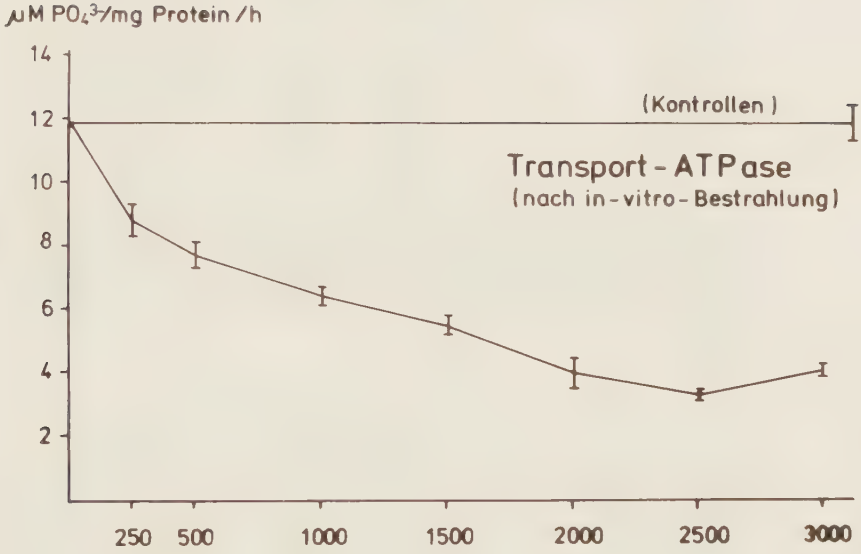


Abb. 1 : Transport-ATPase (µM PO_4^{3-}/mg Protein/h) von Meerschweinchen-Herzventrikeln 30 min nach in-vitro-Bestrahlung

Bestrahlungsdosis	n	Sulfhydrylgehalt	Signifikanz
Kontrollen	127	1,2243 ± o.oo26	
25o R	18	1,2354 ± o,olo7	n.s.
5oo R	18	1,1477 ± o,olo7	p < o,oooo5
1 ooo R	18	1,2312 ± o,oo7o	n.s.
1 5oo R	35	1,1711 ± o,oo5o	p < o,oooo5
2 ooo R	2o	1,1o66 ± o,oo89	p < o,oooo5
2 5oo R	36	1,2o15 ± o,oo33	p < o,oooo5
3 ooo R	18	1,1586 ± o,oo7o	p < o,oooo5

Sulfhydrylgehalt (mmol/ml Enzympräparation) der mikrosomalen ATPase von Meerschweinchenherzen 3o min nach in-vitro-Bestrahlung dargestellt sind die Mittelwerte ± mittlerer Fehler der Mittelwerte. n = Anzahl der Versuche.

TABELLE 1

Zeit nach der Bestrahlung	n	Sulfhydrylgehalt	Signifikanz
Kontrollen	127	1,2243 ± o,oo26	
3o min	35	1,1711 ± o,oo5o	p < o,oooo5
1 h	19	1,1478 ± o,oo64	p < o,oooo5
2 h	19	1,1o16 ± o,oo39	p < o,oooo5
4 h	2o	1,1597 ± o,oo63	p < o,oooo5
6 h	2o	1,1428 ± o,oo49	p < o,oooo5
15 h	2o	1,2o22 ± o,oo67	p < o,oo25
24 h	16	1,2434 ± o,oo55	p < o,o1

Sulfhydrylgehalt (mmol/ml Enzympräparation) der mikrosomalen ATPase von Meerschweinchenherzen nach in-vitro-Bestrahlung mit 1 5oo R
dargestellt sind die Mittelwerte ± mittlerer Fehler der Mittelwerte. n = Anzahl der Versuche.

TABELLE 2

Transport-ATPase

Kontrollen	11,0132 ± 0,5459	n = 36
1500 R	4,9930 ± 0,1589	n = 47

a) Cystein ohne Bestrahlung

10^{-3}	4,3257 ± 1,4183	n = 7
10^{-4}	4,5420 ± 0,8742	n = 7
10^{-5}	6,4346 ± 0,7434	n = 8
10^{-7}	7,8225 ± 0,6150	n = 18

b) Cystein während der Bestrahlung anwesend

10^{-4}	4,9204 ± 0,8149	n = 12
10^{-5}	5,6355 ± 0,5716	n = 18
10^{-6}	5,8542 ± 0,4144	n = 15
10^{-7}	5,5829 ± 0,4929	n = 16

Tabelle 3 : Einfluß verschiedener Cystein-Konzentrationen auf die t-ATPase-Aktivität (µmol P_i/mg Protein/h)

Transport-ATPase

Kontrollen	1o,1528 ± o,5292	n = 34
15oo R	4,3o55 ± o,3539	n = 32

a) Glutathion ohne Bestrahlung

$1o^{-4}$	8,3272 ± o,3o73	n = 14
$1o^{-3}$	9,6898 ± o,7319	n = 2o
$1o^{-2}$	11,353o ± o,69oo	n = 32

b) Glutathion während der Bestrahlung anwesend

$1o^{-4}$	4,5419 ± o,3561	n = 23
$1o^{-3}$	4,8173 ± o,3398	n = 22
$1o^{-2}$	1o,144o ± o,8343	n = 2o

c) Glutathion 1 h nach Bestrahlung zugegeben

$1o^{-4}$	4,4474 ± o,5465	n = 16
$1o^{-3}$	4,3257 ± o,6975	n = 14
$1o^{-2}$	4,72o1 ± o,3645	n = 17

Tabelle 4 : Einfluß verschiedener Glutathion-Konzentrationen auf die t-ATPase-Aktivität (µmol P_i/mg Protein/h)

4. DISKUSSION

4.1. Strahlensensibilität des Membran-ATPase-Systems

Aus den Experimenten, die dieser Arbeit zugrunde liegen, geht hervor, daß die in-vitro-Bestrahlung des Membran-ATPase-Systems zu einer dosisabhängigen Hemmung der Enzymaktivitäten führt (Abb. 1). In der Einleitung wurde mehrfach erwähnt, daß Bestrahlung von Erythrozyten zu veränderten Elektrolytverhältnissen an der Membran führt (1.4., 1.5., 1.6., 1.7.). Am Herzmuskel wies PRIGNITZ (62,63) strahlenbedingte Elektrolytverschiebungen nach. Da die Transport-ATPase ein wesentliches Enzym des aktiven Transportsystems für Natrium- und Kalium-Ionen darstellt, liegt die Vermutung nahe, daß die veränderten Elektrolytverhältnisse nach Bestrahlung zumindest teilweise durch die Hemmung der t-ATPase bedingt sind.

Die dosisabhängige Hemmung der in vitro bestrahlten Enzympräparation ist vergleichbar mit der von PRIGNITZ U. MITARB. gefundenen Hemmung nach in vivo Bestrahlung (61, Abb. 1). Somit ist auszuschließen, daß diese Hemmung nur durch Vorgänge, die einer in vivo Bestrahlung folgen könnten, hervorgerufen wurde.

Sowohl die Aktivitäten des in vivo bestrahlten Enzyms als auch die des in vitro bestrahlten fallen im Dosisbereich von 25o bis 25oo R stark ab. Deutlich höher liegt die Aktivität der ATPase nach in vivo Bestrahlung mit 25o R. Vielleicht wirken sich in diesem niedrigen Dosisbereich sofort nach Bestrahlung einsetzende Reparaturmechanismen aus. Solche Mechanismen werden von SUTHERLAND und PIHL (81) für Erythrozyten angenommen. Sie stellten die These auf, daß Erythrozyten unter aktiven Stoffwechselbedingungen in der Lage sind, durch Bestrahlung entstandene Disulfidbrücken zu reduzieren und wieder in Sulfhydrylgruppen zurückzuführen.

4.2. Die Bedeutung der Sulfhydrylgruppen für die Hemmung der Transport-ATPase

Sulfhydrylblockende Agentien (67,76,77,87) hemmen die Membran-ATPase. Aufgrund dieser Befunde kann man vermuten, daß die SH-Gruppen des Enzymsystems essentiell für seine Wirksamkeit sind. Die Überlegung, daß die Strahlenschutzstoffe Cystein und Glutathion diese Sulfhydrylgruppen schützen könnten, führte dazu, für diese Arbeit auch Experimente mit den genannten Stoffen vorzunehmen. Leider stellte sich heraus, daß Cystein und Glutathion die Enzymaktivitäten auch unabhängig von Bestrahlung beeinflussen. Es konnte kein wirksamer Schutzeffekt festgestellt werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen, die HAMDY U. MITARB. (33) an lysosomalen Enzymen anstellten. Die Autoren beobachteten die Wirkung von Cystein auf einige strahlensensible Enzyme. Sie fanden, daß einige Enzyme durch Cystein gehemmt wurden, andere wurden aktiviert und wieder andere überhaupt nicht beeinflußt. Ebenso war es mit dem erwarteten Strahlenschutzeffekt von Cystein: RNase und Muramidase wurden geschützt, andere Enzyme wurden nicht geschützt oder sogar sensibilisiert. - So lassen sich leider aus den eigenen Versuchen keine Rückschlüsse auf die Bedeutung der SH-Gruppen für die t-ATPase ziehen.

Vergleicht man nun die Dosisabhängigkeit der Hemmung der t-ATPase mit dem Sulfhydrylgehalt des Enzyms nach entsprechender Strahlenexposition, so kann man keine eindeutige Korrelation feststellen. Man findet nur konstant ab Dosen von 1500 R aufwärts einen signifikant niedrigeren SH-Gehalt als bei den unbestrahlten Enzympräparationen.

Wie in der Einleitung erwähnt (1.4.) könnte eine durch SH-Gruppen - Blockierung bewirkte Hemmung des Enzymsystems auf zwei verschiedene Weisen entstehen : Zum einen durch direkte Hemmung des aktiven Zentrums und zum anderen durch eine Konformationsänderung. Sicher ist, daß nur ein sehr ge-

ringer Teil der SH-Gruppen des Enzyms für seine Aktivität bedeutsam ist. Wenn nun nur einige wenige Thiole durch die Bestrahlung verändert werden müssen, um eine Enzymhemmung hervorzurufen, muß es keine eindeutige Korrelation zwischen dosisabhängiger Hemmung der t-ATPase und Sulfhydrylgehalt geben. Durch die Bestrahlung werden nämlich nicht nur diese essentiellen SH-Gruppen angegriffen, sondern auch die vielen für die Funktion unbedeutenden anderen, die nicht alle die gleiche Strahlensensibilität besitzen müssen.

Einen krassen Unterschied zeigt die Zeitabhängigkeitskurve der t-ATPase-Hemmung nach in vivo-Bestrahlung (61, Abb. 4) und die Zeitabhängigkeit des SH-Gehaltes des in-vitro-bestrahlten Enzyms (Tabelle 2). Es läßt sich gar kein Zusammenhang feststellen. Wie auch PRIGNITZ u. Mitarb. (61) vermuten, sind diese t-ATPase-Aktivitäten durch sich in vivo abspielende Vorgänge bedingt, die durch die Versuchsbedingungen bei den Experimenten, die dieser Arbeit zugrunde liegen, ausgeschaltet wurden. Über die Bedeutung des Wiederanstiegs des SH-Gehaltes ab 6 Stunden p.r. kann aufgrund dieser Experimente keine Aussage gemacht werden.

Zwar führen SH-blockende Agentien zu einer Hemmung des Membran-ATPase-Systems, aber es konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der dosis-abhängigen t-ATPase-Hemmung und dem SH-Gehalt der t-ATPase gefunden werden. Das führt zu zwei Fragen, nämlich ob SH-blockende Agentien tatsächlich den gleichen Angriffspunkt wie die Bestrahlung haben und ob die Hemmung der t-ATPase nur durch die Zerstörung der Sulfhydrylgruppen des Enzyms bedingt ist.

Zum ersten Problem läßt sich sagen, daß zwar die Wirkung von einigen SH-Blockern und Bestrahlung auf die Permeabilität für Na^+ und K^+ additiv ist (69,72,73,83), daß aber auch andere Substanzen wie z. B. Lysolecithin einen additiven Effekt zur Bestrahlungswirkung zeigen (43,45). Außerdem kann durch die Strahlenschutzstoffe Cystein und Glutathion zwar der Ef-

fekt von SH-Blockern verhindert werden, nicht aber der der Bestrahlung (73,83). So soll hier die These des gleichen Angriffspunktes von SH-blockenden Agentien und Bestrahlung angezweifelt werden.

Auf die zweite Frage kann im Rahmen dieser Arbeit keine eindeutige Antwort gegeben werden. Die Tatsache, daß keine Korrelation zwischen der dosisabhängigen Hemmung der t-ATPase und der Abnahme des SH-Gehaltes besteht, spricht eher dafür, daß die Hemmung des Enzyms noch durch andere zusätzliche Faktoren bedingt ist. MYERS U. MITARB. (43,45) vertraten die Ansicht, daß für die Veränderung der Membranlipoproteine außer der Oxidation der Thiole noch andere Reaktionen maßgeblich seien. Sie führten als wesentlichen Faktor die Spaltung von Disulfidbindungen an. Auch andere Autoren sehen darin eine bedeutsame Strahlenwirkung (4,31,69). Die Zerstörung der -S-S-Brücken soll demnach zur Zerstörung der Proteinstruktur führen (45). Vielleicht lassen sich diese Vorstellungen auch auf das Membran-ATPase-System übertragen: Im Gefolge der Disulfidspaltung könnten wieder neue Sulfhydrylgruppen entstehen. Damit wäre eine weitere Erklärungsmöglichkeit für das Phänomen, daß der Sulfhydrylgehalt nicht mit steigender Bestrahlungsdosis abnimmt, gegeben.

4.3. Schlußbetrachtung

Die Strahlenwirkung auf die Zellmembran stellt einen komplexen Vorgang dar und ist sicher nicht nur durch eine Zerstörung von Sulfhydryl-Gruppen und eine Spaltung von Disulfidbrücken der t-ATPase erklärbar. Folgende These zur Frage, wodurch die Elektrolytverhältnisse an der Membran nach Bestrahlung beeinflußt werden, ließe sich aufstellen:

Ionisierende Strahlen zerstören diffus durch immer weiter führende Ionisationen die Membranstruktur. Dabei steht neben der Veränderung der Membranlipide eine Veränderung der Membranproteine sowie auch des Enzymsystems des aktiven Transportmechanismus im Vordergrund. Als "loci minoris resistentiae" der Proteine werden die α-C-Atome, die Disulfidbindungen und die Sulfhydryl-Gruppen angesehen (4,48,68,69,81,97). Ein Strahlenangriff auf diese Strukturen kann zur Veränderung der Konformation oder zur Blockierung des aktiven Zentrums von Enzymen führen. Eine Konformationsänderung der Strukturproteine kann eine veränderte Permeabilität der Membran bedingen, eine Konformationsänderung oder eine Blockierung des aktiven Zentrums der Enzyme kann sich in einem Nachlassen der Na^+ und K^+-Pumpe äußern. Diese beiden Vorgänge könnten die wesentliche Ursache für die veränderten Elektrolytverhältnisse an der Membran nach Bestrahlung bilden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

An einer durch fraktionierte Zentrifugation präparierten Mikrosomenfraktion aus Myokardzellen des Meerschweinchens wurde das Verhalten eines Mg^{2+}-abhängigen, Na^{+}- und K^{+}-aktivierbaren Adenosintriphosphatase-Systems nach in-vitro-Bestrahlung untersucht. Sein durch Na^{+}- und K^{+}-Ionen aktivierbarer Teil, der auch Transport-ATPase genannt wird, erwies sich als besonders strahlensensibel.

Bei Messungen, die 3o Minuten nach der Bestrahlung durchgeführt wurden, ergab sich bereits durch Strahlendosen von 25o R eine Hemmung. Das Maximum der Hemmung wurde durch 25oo R hervorgerufen. Bei dieser Dosis nahm die Aktivität um ca. 7o % ab.

Der Sulfhydrylgehalt der ATPase-Präparationen wurde nach Bestrahlung mit Dosen von 25o bis 3ooo R gemessen. Die Bestimmungen wurden mit Ellman's Reagenz durchgeführt. Der SH-Gehalt der mit 25o R und mit looo R bestrahlten Proben unterschied sich nicht wesentlich von den unbestrahlten Kontrollen. Alle anderen Proben zeigten einen signifikant niedrigeren Gehalt an Sulfhydrylen. Es konnte keine Dosisabhängigkeit festgestellt werden.

Nach einer Bestrahlung mit 15oo R wurde die Entwicklung des SH-Gehaltes über einen Zeitraum von 24 Stunden beobachtet. Es ergab sich kein eindeutiger Kurvenverlauf, der auf die Beeinflussung durch bestimmte Faktoren zurückgeführt werden könnte. Nach 2 Stunden erreichte der Sulfhydrylgehalt ein Minimum, nach 24 Stunden unterschied sich der Wert nur noch wenig von dem der unbestrahlten Kontrollen.

Die Strahlenschutzstoffe Cystein und Glutathion beeinflußten die Aktivität der Transport-ATPase wesentlich. Beide Stoffe hemmten das Enzym, wobei die Hemmung durch Cystein bei hohen Cysteinkonzentrationen stärker wurde, während Glutathion in niedrigen Konzentrationen zu einer deutlicheren Hemmung

führte. Ein Strahlenschutzeffekt konnte weder durch Cystein noch durch Glutathion erreicht werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1.) ADAMS, G.E., WILLSON, R.L., ALDRICH, J.E., CUNDALL, R.B.
On the mechanism of the radiation-induced inactivation of lysozyme in dilute aqueous solution
Int. J. Radiat. Biol. 16 (1969) 333

2.) ADAMS, G.E., WILLSON, R.L., BISBY, R.H., CUNDALL, R.B.
On the mechanism of the radiation-induced inactivation of ribonuclease in dilute aqueous solution
Int. J. Radiat. Biol. 20 (1971) 405

3.) AIKMAN, A.A., WILLS, E.D.
Studies on lysosomes after irradiation.
II. Lysosomal membrane permeability and acid phosphatase activity of lymphoid and other tissues after whole-body irradiation
Radiat. Res. 57 (1974) 446

4.) ARCHER, J.F., WILLS, E.D.
Effects of ionizing radiation on sulphydryl and disulphide components of cultured mammalian cells
Int. J. Radiat. Biol. 23 (1973) 571

5.) AUDITORE, J.V., MURRAY, L.
The localization of the Mg + Na + K - activated g- strophanthin sensitive ATPase in cardiac muscle
Arch. Int. Pharmacodyn. 145 (1963) 137

6.) BACQ, Z.M.
Chemical protection against ionizing radiation
Charles C Thomas, Springfield, Illinois, USA (1965)

7.) BACQ, Z.M., ALEXANDER, P.
Importance for radioprotection of the reaction of cells to sulphydryl and disulfide compounds
Nature (Lond.) 2o3 (1964) 62

8.) BERGEDER, H.-D.
Untersuchungen zum Einfluß ionisierender Strahlen auf Zellmembranen
I. Änderung von Erregungsabläufen durch Röntgenstrahlen
Strahlentherapie 114 (1961) 4o6

9.) BERGEDER, H.-D.
Untersuchungen zum Einfluß ionisierender Strahlen auf Zellmembranen
II. Änderung von Membranpotential und Kaliumgehalt unter Einwirkung von Röntgenstrahlen
Strahlentherapie 115 (1961) 9o

10.) BERGEDER, H.-D., HOCKWIN, O.
Beeinflussung des Phosphatstoffwechsels isolierter Muskeln durch Röntgenbestrahlung
Strahlentherapie 113 (196o) 2o7

11.) BERGEDER, H.-D., HOCKWIN, O.
Änderung des Sauerstoffverbrauches isolierter Froschmuskeln nach Röntgenbestrahlung
Naturwissenschaften 47 (196o) 161

12.) BIDE, R.W., MYERS, D.K.
Effect of thiol-masking agents on the stromata of rat erythrocytes
Canad. J. Biochem. 45 (1967) 19

13.) BRAAMS, R.
Rate constants of hydrated electron reactions with amino acids
Radiat. Res. 27 (1966) 319

14.) BRAAMS, R., EBERT, M.
The influence of changes in conformation of a macromolecule on reaction rates
Advances in Chem. 81 (1968) 464

15.) BRESCIANI, F., AURICCHIO, F., FIORE, C.
Effect of X-rays on movements of sodium in human erythrocytes
Radiat. Res. 21 (1964) 394

16.) BRESCIANI, F., AURICCHIO, F., FIORE, C.
A biochemical study of the X-radiation-induced inhibition of sodium transport (Na pump) in human erythrocytes
Radiat. Res. 22 (1964) 463

17.) BRINKMAN, R., LAMBERTS, H.B.
Direct registration of an instantaneous X-ray effect in rats and man
Nature (Lond.) 181 (1958) 774

18.) CHANGEUX, J.-P., THIERY, J., TUNG, Y., KITTEL, C.
On the cooperativity of biological membranes
Proc. Natl. Acad. Sci. (US) 57 (1967) 335

19.) CHANGEUX, J.-P., THIERY, J.
On the excitability and cooperativity of biological membranes
IN : JÄRNEFELT, J.
Regulatory functions of biological membranes p. 115
Amsterdam : Elsevier (1968)

20.) CHAPMAN, I.V., STURROCK, M.G.
The effects of X-ray in vitro on the transport of potassium ions in thymocytes
Int. J. Radiat. Biol. 22 (1972) 1

21.) CIVIDALLI, G.
Effect of gamma irradiation on glucose utilization, glutathione, and electrolyte content of the human erythrocyte
Radiat. Res. 2o (1963) 564

22.) DAVIES, J.V., EBERT, M., SWALLOW, A.J.
Reactions of the hydrated electron with glycine and other aminoacids and peptids
IN : EBERT, M., KEENE, J.P., SWALLOW, A.J., BAXENDALE, J.H.
Pulse radialysis p. 165
London, New York : Academic Press 1965

23.) DAWSON, K.B., SEYMOUR, R., MUTTON, D.E.
Radiation-induced efflux of intracellular potassium
Radiat. Res. 37 (1969) 83

24.) ELDJARN, L., PIHL, A.
Mechanisms of protective and sensitizing action
IN : ERRERA, M., FORSSBERG, A.
Mechanisms in radiobiology
Vol. II, p. 231
Academic Press, NewYork 1960

25.) ELLMAN, G.L.
Tissue sulfhydryl groups
Arch. Biochem. Biophys. 82 (1959) 70

26.) FILIPPOVICH, I.V., KOLESNIKOV, E.E., SHEREMETYEVSKAYA, T.N., TARASENKO, A.T., ROMANTZEV, E.F.
Mechanisms of "biochemical shock" - III
Comparative study of biochemical effects induced by a radioprotective and a non-radioprotective compound of isomer structure
Biochem. Pharmacol. 22 (1973) 815

27.) FRICKE, U.
Über den Einfluß verschiedener Cardenolide auf die Herzmuskelfunktion und die Membran-ATPase-Aktivität bei Meerschweinchen
Dissertation (Mainz) 1970

28.) FRICKE, U., KLAUS, W.
Die Haftung verschiedener Cardenolide am Papillarmuskel und einer mikrosomalen ATPase des Meerschweinchenherzens
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 268 (1971) 200

29.) FRICKE,U., KLAUS, W.
A simple preparation technique for a microsomal Na-, K- activated ATPase from cardiac tissues of different species
Prep. Biochem. 4 (1974) 13

30.) GAFFEY, C.T.
Electrophysiologic responses of sciatic nerves exposed to 200-kV X-rays and 47.5-MeV protons
Advanc. Biol. Med. Phys. 13 (1971) 351

31.) GORDY, W., SHIELDS, H.
Structure and orientation of free radicals formed by ionizing radiations in certain native proteins
Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 46 (1960) 1124

32.) GÜNTHER, J., HUG, O.
Akute Wirkungen von Röntgenstrahlen auf Membranpotential und -widerstand von Schneckenneuronen
Rad. and Environm. Biophys. 11 (1974) 171

33.) HAMDY, M.K., NOAMAN, M., CASTER, W.O.
Effects of cysteine and 4-amino-1-naphthol on solutions of lysosomal enzymes exposed to high doses of radiation
Radiat. Res. 38 (1969) 214

34.) HEITMANN, J.-J., STURDE, H.-C.
Experimentelle Untersuchungen zur Strahlenschutzwirkung von Cystein und Cysteamin (1. Mitteilung)
Strahlentherapie 139 (1970) 91

35.) HENDLER, R.W.
Biological membrane ultrastructure
Physiol. Rev. 51 (1971) 66

36.) HUGHES, R.C.
Glycoproteins as components of cellular membranes
Progr. Biophys. 26 (1973) 189

37.) KOLLMANN, G., SHAPIRO, B., MARTIN, D.
The mechanism of radiation hemolysis in human erythrocytes
Radiat. Res. 37 (1969) 551

38.) LANGE, D.
I. Physikalische Grundlagen
IN : 'Kursus : Radiologie und Strahlenschutz'
Hrsg.: Radiologisches Zentrum der Universität Heidelberg
Heidelberger Taschenbuch HT Basistext 112
Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York
1972 S. 11

39.) LANGENDORFF, H.
Zum Wirkungsmechanismus strahlenresistenz-erhöhender Substanzen
Strahlentherapie 140 (1970) 428

40.) LANGENDORFF, H.
Zum cyclischen AMP - Mechanismus bei der Wirkung von Strahlenschutzsubstanzen
Naturwissenschaften 32 (1970) 455

41.) LICHTIN, N.N., OGDAN, J., STEIN, G.
Fast consecutive radical processes within the ribonuclease molecule in aqueous solution. II. Reaction with OH radicals and hydrated electrons
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 276 (1972) 124

42.) MARSH, B.B.
The estimation of inorganic phosphate in the presence of adenosine triphosphate
Biochim. Biophys. Acta 32 (1959) 357

43.) MYERS, D.K.
Some aspects of radiation effects on cell membranes
Advanc. biol. med. phys. 13 (1970) 213

44.) MYERS, D.K., BIDE, R.W.
Biochemical effects of X-irradiation on erythrocytes
Radiat. Res. 27 (1966) 250

45.) MYERS, D.K., CHURCH, M.L.
Inhibition of stromal enzymes by X-radiation
Nature (Lond.) 213 (1967) 636

46.) MYERS, D.K., LEVY, L.
Adenosine-triphosphatase and potassium retention in X-irradiated erythrocytes
Nature (Lond.) 204 (1964) 1324

47.) MYERS, D.K., SLADE, D.E.
Radiosensitization of mammalian cells by iodoacetamide and related compounds
Radiat. Res. 30 (1967) 186

48.) NAKKEN, K.F.
Radiation damage to erythrocyte membranes
and its modification
Strahlentherapie 129 (1966) 586

49.) NAKKEN, K.F.
Radiation damage to erythrocyte membranes
and its modification
Strahlentherapie 129 (1966) 586
S. 593 nach :
ROTHSTEIN, A., WEED, R.I.
The functional significance of sulfhydryl
groups in the cell membrane
The University of Rochester Atomic Energy
Project UR- 633 (1963)

50.) PASSOW, H.
The red blood cell : penetration,
distribution, and toxic actions of
heavy metals
IN : MANILOFF, J., COLEMAN, J.R., MILLER, M.W.
Effects of metals on cells, subcellular
elements, and macromoleculs p. 291
Charles C Thomas. Springfield, Klinois USA
1971

51.) PATT, H.M.
Protective mechanisms in ionizing
radiation injury
Physiol. Rev. 33 (1953) 35

52.) PERRIS, A.D., MYERS, D.K.
An effect of sugars on fluid entry
into erythrocytes
Nature (Lond.) 2o7 (1965) 986

53.) POLITZER, I.R., GRIFFIN, G.W., LASETER, J.L.
Singlet oxygen and biological systems
Chem.-Biol. Interactions, Amsterdam
Bd. 3 (1971) 73

54.) PORTELA, A., GARFUNKEL, M., VACCARI, J.,
DELBUE, A.M., STEWART, P.A., PEREZ, J.C.
Radiation effects on water permeability
and distribution in frog muscle cells
Radiat. Res. 47 (1971) 7o4

55.) PORTELA, A., HINES, M., PEREZ, J.C.,
BOURNE, G.H., STEWART, P., GROTH, D.
Effects of X-irradiation on muscle membrane
Exptl. Cell Res. 21 (196o) 468

56.) PORTELA, A., PEREZ, J.C., STEWART, P.,
HINES, M.
Ion effects in X-ray depolarization of
muscle membrane
Exptl. Cell Res. 31 (1963) 281

57.) PORTELA, A., PEREZ, J.C., STEWART, P.,
HINES, M., REDDY, V.
Radiation damage in muscle cell membranes
and regulation of cell metabolism
Exptl. Cell Res. 29 (1963) 527

58.) PORTIUS, H.J., REPKE, K.R.H.
Darstellung des $Na^{+}+K^{+}$ aktivierten,
Mg^{++}- abhängigen Adenosintriphosphat-
Phosphorylase- Systems des Herzmuskels
durch Isolierung von Zellmembranen
Acta biol. med. germ. 19 (1967) 879

59.) PORTIUS, H.J., REPKE, K.R.H.
Eigenschaften und Funktion des $Na^{+}+K^{+}$-aktivierten, Mg^{++}- abhängigen Adenosintriphosphat- Phosphorylase-Systems des Herzmuskels
Acta biol. med. germ. 19 (1967) 907

60.) PRIGNITZ, R.
Frühreaktionen des Herzmuskels nach lokaler Bestrahlung
Habilitationsschrift, Marburg (1975)

61.) PRIGNITZ, R., FRÖHLICH, D., HOFFMEISTER, G.
Untersuchungen über den Einfluß von Röntgenstrahlen auf Elektrolytverschiebungen und Stoffwechsel des Herzmuskels
VII. Strahlenbedingte Hemmung einer Na^{+}- und K^{+}- aktivierbaren mikrosomalen Transport- ATPase
Strahlentherapie 151 (1976) 356

62.) PRIGNITZ, R., HOFFMEISTER, G.
Untersuchungen über den Einfluß von Röntgenstrahlen auf Elektrolytverschiebungen und Stoffwechsel des Herzmuskels
I. Strahlenbedingte Calciumveränderungen am isolierten Meerschweinchenvorhof
Strahlentherapie 145 (1973) 207

63.) PRIGNITZ, R., MÜLLER, U., HOFFMEISTER, G.
Untersuchungen über den Einfluß von Röntgenstrahlen auf Elektrolytverschiebungen und Stoffwechsel des Herzmuskels
II. Strahlenbedingte Veränderungen der Kalium- und Natrium-Konzentrationen am isolierten Meerschweinchenvorhof
Strahlentherapie 145 (1973) 427

64.) RATHGEN, G.H.
Untersuchungen über den Einfluß von Röntgenbestrahlungen auf den Gehalt einiger Rattenorgane an oxydiertem und reduziertem Glutathion
Strahlentherapie 138 (1969) 232

65.) RATHGEN, G.H.
Der Einfluß von Cystein auf die strahleninduzierten Veränderungen des Glutathiongehaltes einiger Rattenorgane
Strahlentherapie 139 (1970) 243

66.) RATHGEN, G.H., LIESER, H.
Zur Bedeutung des Glutathion bei der Strahlenwirkung und beim chemischen Strahlenschutz
Strahlentherapie 143 (1972) 670

67.) REGA, A.F., ROTHSTEIN, A., WEED, R.I.
Erythrocyte membrane sulfhydryl groups and the active transport of cations
J. Cell. Physiol. 70 (1967) 45

68.) RINK, H.R.
Folgen und Ursachen strahlenbedingter Elektrolytverschiebungen
Habilitationsschrift, Bonn (1975)

69.) RINK, H.R.
Radiation damage to membrane-bound sulphydryl groups and permeability of yeast cells
Int. J. Radiat. Biol. 27 (1975) 305

70.) ROTHENBERG, M.A.
Studies on permeability in relation to nerve function
II. Ionic movements across axonal membranes
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 4 (1950) 96

71.) SCOTT, D.B.Mc N., REISKIN, A.B., PAKOSKEY, A.M.
Changes in thiol content of the hamster cheek pouch after X-irradiation and some speculations on the relationship between phospholipids and protein thiol groups
Biochem. J. 93 (1964) 1c

72.) SHAPIRO, B., KOLLMANN, G.
The nature of membrane injury in irradiated human erythrocytes
Radiat. Res. 34 (1968) 335

73.) SHAPIRO, B., KOLLMANN, G., ASNEN, J.
Mechanism of the effect of ionizing radiation on sodium uptake by human erythrocytes
Radiat. Res. 27 (1966) 139

74.) SHAPIRO, B., KOLLMANN, G., ASNEN, J.
Mechanism of the effect of ionizing radiation on sodium uptake by human erythrocytes
Radiat. Res. 27 (1966) 139
S. 157 nach :
ROTHSTEIN, A., WEED, R.I.
The functional significance of sulfhydryl groups in the cell membrane
Atomic Energy Commission Research and Development Report UR-633,
Contract W-7401-eng-49 (Nov. 29, 1963)

75.) SHAPIRO, B., KOLLMANN, G., MARTIN, D.
The diversity of sulfhydryl groups in the human erythrocyte membrane
J. Cell. Physiol. 75 (197o) 281

76.) SKOU, J.C.
Studies on the $Na^+ + K^+$ activated ATP Hydrolysing enzyme system
Biochem. Biophys. Res. Comm. lo (1963) 79

77.) SKOU, J.C.
Enzymatic base for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane
Physiol. Rev. 45 (1965) 596

78.) STREFFER, C.
Erhöhung der Überlebensrate von Säugetieren durch chemische Substanzen nach Einwirkung ionisierender Strahlen
Umschau in Wissenschaft und Technik 16 (1968) 492

79.) STREFFER, C.
Strahlenbiochemie
Heidelberger Taschenbuch HT 59/60
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1969)

80.) STREFFER, C.
Strahlenbiochemie
Heidelberger Taschenbuch HT 59/60
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1969)
S. 13. nach :
BACQ, Z.M. and P. ALEXANDER
Fundamentals in radiobiology, 2nd edition
Oxford, London, Edinburgh, New York, Toronto, Paris, Frankfurt
Pergamon Press 1966

81.) SUTHERLAND, R.M., PIHL, A.
Repair of radiation damage to erythrocyte membranes:
The reduction of radiation-induced disulfide groups
Radiat. Res. 34 (1968) 300

82.) SUTHERLAND, R.M., ROTHSTEIN, A., WEED, R.I.
Erythrocyte membrane sulfhydryl groups and cation permeability
J. Cell. Physiol. 69 (1967) 185

83.) SUTHERLAND, R.M., STANNARD, A., WEED, R.I.
Involvement of sulphhydryl groups in radiation damage to the human erythrocyte membrane
Int. J. Radiat. Biol. 12 (1967) 551

84.) SCHUBERT, J., SANDERS, E.B.
Cytotoxic radiolysis products of irradiated α,β-unsaturated carbonyl sugars as the carbohydrates
Nature (Lond.) New Biol. 233 (1971) 199

85.) SCHÜSSLER, H.
Einwirkung ionisierender Strahlung auf Proteine in wässriger Lösung
Biophysik 9 (1973) 315

86.) TIMMERMANN, J.
Untersuchung von Membranveränderungen erregbarer Herzzellen nach energiereicher Bestrahlung
Strahlentherapie 148 (1974) 180

87.) TOSTESON, D.C.
Some properties of the plasma membranes
of high potassium and low potassium
sheep red cells
Ann. N. Y. Acad. Sci. 137 (1966) 577

88.) VANSTEVENINCK, J., WEED, R.I., ROTHSTEIN, A.
Localization of erythrocyte membrane sulf-
hydryl groups essential for glucose transport
J. gen. Physiol. 48 (1965) 617

89.) WALLACH, D.F.H., KNÜFERMANN, H.G.
Plasmamembranen
Chemie, Biologie und Pathologie
Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1973

90.) WALLACH, D.F.H., ULLEREY, D.
Studies on the surface and cytoplasmic
membrane of Ehrlich Ascites cells
II. Alcali-cation- activated adenosine
triphosphate hydrolysis in microsomal
membrane fragments
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 88 (1964) 620

91.) WALLACH, D.F.H., WEIDEKAMM, E.
Strahleneffekte an Biomembranen
Klin. Wschr. 51 (1973) 419

92.) WALLACH, D.F.H., WEIDEKAMM, E.
Strahleneffekte an Biomembranen
Klin. Wschr. 51 (1973) 419
S. 420. nach :
ADAMS, G.E., Mc NAUGHTON, G.S., MICHAEL, B.D.
Pulse radiolysis of sulphur compounds
Trans. Farady Soc. 64 (1968) 902

93.) WHITTAM, R., WHEELER, K.P.
Transport across cell membranes
Ann. Rev. Physiol. 32 (1970) 21

94.) WILLS, E.D.
The effect of irradiation on sub-cellular components. Metal ion transport in mitochondria
Int. J. Rad. Biol. 11 (1966) 517

95.) WILLS, E.D., WILKINSON, A.E.
Release of enzymes from lysosomes by irradiation and the relation of lipid peroxid formation to enzyme release
Biochem. J. 99 (1966) 657

96.) WILLS, E.D., WILKINSON, A.E.
The effect of irradiation on lipid peroxid formation in subcellular fractions
Radiat. Res. 31 (1967) 732

97.) WILLS, E.D., WILKINSON, A.E.
The effect of irradiation on sub-cellular particles - Destruction of sulphydryl groups
Int. J. Radiat. Biol. 13 (1967) 45

98.) WOODBURY, J.W.
Studies on membrane resting potentials of muscle
Exptl. Cell Res., Suppl. 5 (1958) 547

Herrn Dr. med. habil. Rolf Prignitz und Frau Gerda Hoffmeister möchte ich meinen herzlichen Dank für die Überlassung des Themas und für die hilfsbereite Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit aussprechen.

LEBENSLAUF

Geboren am 20.11.1951 in Hamburg.
Erwerb der Hochschulreife des Alten Gymnasiums in Bremen am 17.5.1971.
Studium der Humanmedizin an der Universität Marburg/Lahn von 1971 bis 1978.
Eheschließung am 20.5.1977.
Staatsexamen am 26.10.1978.

VERZEICHNIS MEINER AKADEMISCHEN LEHRER

Amon, H., Aziz, O., Braasch, D., Buchholz, R., Daume, E., Denhard, R., Dittrich, J., Dombrowski, H., Doss, M., Egbrink, R., Eißner, H., Eschenbach, C., Exner, G., Friederich, H., Gerdes, H., Geus, H., Golenhofen, K., Graul, E.H., Grundner, H.G., Habermehl, A., Haberich, F.J., Hamelmann, H., Hardewig, A., Havemann, K., Hensel, H., Hess, F., Hildebrand, G., Hilgermann, R., Hort, W., Huch, A., Ihm, P., Josef, K., Kaffarnik, H., Karlson, P., Kleinsasser, O., Koransky, O., Kuni, H., Lange, H., Lehmann, F.G., Lorenz, W., Ludwig, G., Lütke, A., Mannheim, W., Maroske, D., Martini, G.A., Neurath, F., Niemeyer, W., Petry, G., Pohlen, M., Portig, J., Pots, P., Riecken, E.O., Rohen, J.W., Rodeck, G., Schaumlöffel, E., Schiff, W., Schmidt, W., Schmitz-Moormann, P., Siegert, R., Siegrist, J., Solcher, H., Sturm, G., Straub, W., Stutte, H., Welge-Lüssen, W., Wendt, G.G., Willenbockel, U.